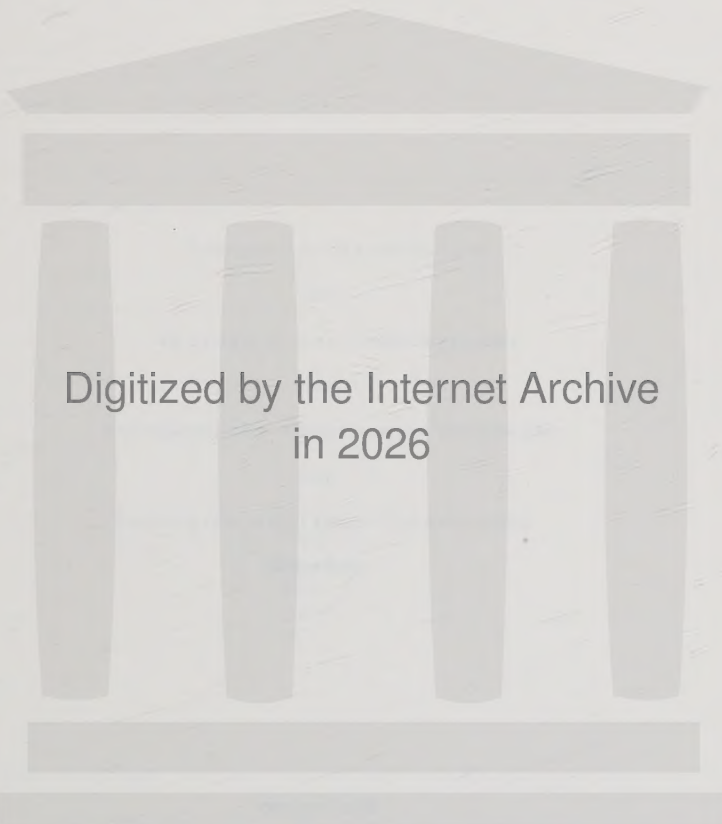


**Anreicherung und Charakterisierung von DNA-
Polymerase aus *Physarum polycephalum***

Anton Bär

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Anreicherung und Charakterisierung von DNA-
Polymerase aus *Physarum polycephalum*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Anton Bär
München 1979



1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der Einreichung der Arbeit: 19. 1. 1979

Tag der mündlichen Prüfung: 8. 3. 1979

Die vorliegende Arbeit wurde von Dezember 1975 bis Dezember 1978 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. W. Schiebel in der Abteilung "Experimentelle Medizin" (Leitung Professor Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer) am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Herrn Dr. W. Schiebel danke ich herzlich für zahlreiche Anregungen und Diskussionen.

Herrn Professor Dr. F. Eiden danke ich für die Übernahme des zweiten Referates.

Fräulein B. Wolff bin ich für die zuverlässige Mitarbeit zu großem Dank verpflichtet.

Für die Ermöglichung der Teilnahme an der Internationalen Sommerschule in Spetsai, Griechenland, und die Finanzierung danke ich der Max-Planck-Gesellschaft.

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der	2
3.	Die Bedeutung der	3
4.	Die Bedeutung der	4
5.	Die Bedeutung der	5
6.	Die Bedeutung der	6
7.	Die Bedeutung der	7
8.	Die Bedeutung der	8
9.	Die Bedeutung der	9
10.	Die Bedeutung der	10
11.	Die Bedeutung der	11
12.	Die Bedeutung der	12
13.	Die Bedeutung der	13
14.	Die Bedeutung der	14
15.	Die Bedeutung der	15
16.	Die Bedeutung der	16
17.	Die Bedeutung der	17
18.	Die Bedeutung der	18
19.	Die Bedeutung der	19
20.	Die Bedeutung der	20
21.	Die Bedeutung der	21
22.	Die Bedeutung der	22
23.	Die Bedeutung der	23
24.	Die Bedeutung der	24
25.	Die Bedeutung der	25
26.	Die Bedeutung der	26
27.	Die Bedeutung der	27
28.	Die Bedeutung der	28
29.	Die Bedeutung der	29
30.	Die Bedeutung der	30
31.	Die Bedeutung der	31
32.	Die Bedeutung der	32
33.	Die Bedeutung der	33
34.	Die Bedeutung der	34
35.	Die Bedeutung der	35
36.	Die Bedeutung der	36
37.	Die Bedeutung der	37
38.	Die Bedeutung der	38
39.	Die Bedeutung der	39
40.	Die Bedeutung der	40
41.	Die Bedeutung der	41
42.	Die Bedeutung der	42
43.	Die Bedeutung der	43
44.	Die Bedeutung der	44
45.	Die Bedeutung der	45
46.	Die Bedeutung der	46
47.	Die Bedeutung der	47
48.	Die Bedeutung der	48
49.	Die Bedeutung der	49
50.	Die Bedeutung der	50
51.	Die Bedeutung der	51
52.	Die Bedeutung der	52
53.	Die Bedeutung der	53
54.	Die Bedeutung der	54
55.	Die Bedeutung der	55
56.	Die Bedeutung der	56
57.	Die Bedeutung der	57
58.	Die Bedeutung der	58
59.	Die Bedeutung der	59
60.	Die Bedeutung der	60
61.	Die Bedeutung der	61
62.	Die Bedeutung der	62
63.	Die Bedeutung der	63
64.	Die Bedeutung der	64
65.	Die Bedeutung der	65
66.	Die Bedeutung der	66
67.	Die Bedeutung der	67
68.	Die Bedeutung der	68
69.	Die Bedeutung der	69
70.	Die Bedeutung der	70
71.	Die Bedeutung der	71
72.	Die Bedeutung der	72
73.	Die Bedeutung der	73
74.	Die Bedeutung der	74
75.	Die Bedeutung der	75
76.	Die Bedeutung der	76
77.	Die Bedeutung der	77
78.	Die Bedeutung der	78
79.	Die Bedeutung der	79
80.	Die Bedeutung der	80
81.	Die Bedeutung der	81
82.	Die Bedeutung der	82
83.	Die Bedeutung der	83
84.	Die Bedeutung der	84
85.	Die Bedeutung der	85
86.	Die Bedeutung der	86
87.	Die Bedeutung der	87
88.	Die Bedeutung der	88
89.	Die Bedeutung der	89
90.	Die Bedeutung der	90
91.	Die Bedeutung der	91
92.	Die Bedeutung der	92
93.	Die Bedeutung der	93
94.	Die Bedeutung der	94
95.	Die Bedeutung der	95
96.	Die Bedeutung der	96
97.	Die Bedeutung der	97
98.	Die Bedeutung der	98
99.	Die Bedeutung der	99
100.	Die Bedeutung der	100

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	DNA-Replikation	1
1.2.	DNA-Polymerasen in anderen Prozessen	2
1.3.	Reaktionsbedingungen von DNA-Polymerase	3
1.4.	DNA-Polymerasen aus Prokaryonten	4
1.5.	DNA-Polymerasen aus Eukaryonten	4
1.5.1.	DNA-Polymerase- α	5
1.5.2.	DNA-Polymerase- β	8
1.5.3.	DNA-Polymerase- γ	9
1.5.4.	Mitochondriale (mt)-DNA-Polymerase	9
1.6.	DNA-Polymerasen aus niederen Eukaryonten	10
1.7.	Modellorganismus Physarum polycephalum	11
1.8.	Zellzyklus von Physarum polycephalum	11
1.9.	DNA-Polymeraseaktivität im Zellzyklus	12
2.	Material und Methoden	15
2.1.	Verwendete Geräte	15
2.2.	Verwendete Chemikalien	16
2.3.	Abkürzungen	18
2.4.	Medium und Puffer	19
2.5.	Einengen von Proteinlösungen	20
2.6.	Ammoniumsulfat-Fällung	21
2.7.	Polymin P Fällung	22
2.8.	Präparation von DNA-Cellulose	22
2.9.	Präparation von einzelsträngiger DNA-Cellulose	23

	<u>Seite</u>
2.10. Präparation von Dextranblau-Sepharose 4B	23
2.11. Präparation von Heparin-Sepharose 4B	24
2.12.1. Kalibrierung analytischer Gelfiltrations- säulen	24
2.12.2. Programm zur Berechnung von K_d -Werten	27
2.12.3. Berechnung der K_d -Werte mit Hilfe des in 2.12.2. dargestellten Programms	27
2.13. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten	29
2.14. Züchtung von Physarum polycephalum	29
2.14.1. Mikroplasmodien in konventionellem Maßstab	30
2.14.2. Mikroplasmodien großer Menge	30
2.15. DNA-Polymerasetest	31
2.16. Proteinbestimmung nach Neßler	33
2.17. Proteinbestimmung nach Lowry et al.	34
2.18. Auswertung der Proteinbestimmung nach Lowry	35
2.18.1. Gauß-Doolittle-Schema	39
2.18.2. Programm zur Approximation eines Polynoms dritten Grades und zur Berechnung der Pro- teinmenge aus den eingegebenen Extinktions- werten	41
2.18.3. Beispiel zur Berechnung einer Approximations- funktion und von Proteingehalten nach dem in 2.18.2. dargestellten Programm	45
2.19. Proteinbestimmung durch UV-Absorption	48
2.20. DNA-Bestimmung mit Diphenylamin nach Burton	48
2.21. Bestimmung der β -Galaktosidase (EC 3.2.1.23.)	49
2.22. Bestimmung der Katalase (EC 1.11.1.6.)	50
2.23. Bestimmung der Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1.)	50
2.24. Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27.)	51

2.25.	Herstellung von aktivierter DNA	51
2.26.	Präparation von denaturierter DNA, von $p(A) \cdot (dT)_{10}$ (A:T = 20:1) und $p(dA) \cdot (rU)_{12-18}$	53
2.27.1.	Nicht-denaturierende Elektrophorese	54
2.27.2.	Reelektrophorese	56
2.27.3.	Präparative nicht-denaturierende Elektrophorese	57
2.28.	Isoelektrische Fokussierung	58
2.29.	SDS-Elektrophorese	60
2.29.1.	Herstellung des exponentiellen Gradienten	62
2.29.2.	Präparation von Protein für SDS-Elektrophorese	63
3.	Ergebnisse und Diskussion	65
3.1.	Anreicherung von DNA-Polymerase	65
3.1.1.	Präparation von Schritt-1 Enzym	65
3.1.2.	Gelfiltration an Sepharose Cl 6B	65
3.1.3.	DEAE-Sephadex A25 Chromatografie I	68
3.1.4.	DNA-Cellulose Chromatografie	68
3.1.5.	DEAE-Sephadex A25 Chromatografie II	70
3.2.	Physikalische Parameter der DNA-Polymerase	72
3.3.	Charakterisierung der katalytischen Aktivität des Enzyms	78
3.3.1.	Zeitabhängigkeit des Einbaus von $[^3H]$ dTMP in aktivierte DNA	78
3.3.2.	Temperaturabhängigkeit der DNA-Polymeraseaktivität	78
3.3.3.	Abhängigkeit des $[^3H]$ dTMP-Einbaus von der Enzym- menge und der An- oder Abwesenheit von 2 mM Spermidin	78
3.3.4.	pH-Optimum der Enzymaktivität	80
3.3.5.	Wirkung von K^+ - und Mg^{++} -Ionen	81

3.3.6.	Wirkung von Starter-Matrizen	83
3.3.7.	Wirkung von Desoxynukleosid-5'-triphosphaten	83
3.3.8.	Inhibitoren	87
3.3.9.	Unterschiedliche Wirkung von Spermidin	93
3.4.	Anreicherung von DNA-Polymerase im präparativen Maßstab	96
3.4.1.	Anreicherung mit Ammoniumsulfat-Fällung als erstem Schritt	96
3.4.1.1.	Homogenat und Ammoniumsulfat-Fällung	96
3.4.1.2.	DEAE-Cellulose Batch	98
3.4.1.3.	DNA-Cellulose Chromatografie	99
3.4.1.4.	Phospho-Cellulose Chromatografie	99
3.4.1.5.	DEAE-Sephadex A25 Chromatografie	100
3.4.1.6.	Nicht-denaturierende Elektrophorese	100
3.4.1.7.	Isoelektrische Fokussierung	102
3.4.1.8.	Analytische Gelfiltration	102
3.4.1.9.	Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation	102
3.4.1.10.	Diskussion	104
3.4.2.	Präparative Anreicherung mit Polymin P Fällung als erstem Schritt	106
3.4.2.1.	Homogenat und Polymin P Fällung	106
3.4.2.2.	Chromatografie an DEAE-Sephacel	107
3.4.2.3.	Nicht-denaturierende Elektrophorese	107
3.4.2.4.	Isoelektrische Fokussierung	109
3.4.2.5.	Präparative nicht-denaturierende Elektrophorese	111
3.4.2.6.	SDS-Elektrophorese	111
3. 5.	Versuche zur Methodik	115
3.5.1.	DNase I Behandlung des markierten Reaktionsproduktes	115

3.5.2.	Zunahme der Aktivität von Homogenat und Homogenat-Überstand bei Lagerung	115
3.5.3.	Einfluß verschiedener Reagenzien auf die DNA-Polymeraseaktivität	116
3.5.3.1.	Ammoniumsulfat	116
3.5.3.2.	Harnstoff	116
3.5.3.3.	β -Mercaptoäthanol	118
3.5.3.4.	Natriumazid	119
3.5.3.5.	ATP-Abhängigkeit der Enzymaktivität	119
3.5.4.	Geschieht die Bindung von DNA-Polymerase an DEAE-Ionenaustauscher über Nukleinsäuren?	119
3.5.5.	Verhalten von DNA-Polymerase nach Chromatographie an Phospho-Cellulose	120
3.5.6.	Einfluß der Proteinkonzentration auf den Sedimentationskoeffizienten	122
3.5.7.	Stabilität von DNA-Polymerase-Präparationen	123
4.	Zusammenfassung	126
5.	Literaturverzeichnis	128

1. Einleitung

1.1. DNA-Replikation

Betrachtet man biochemische Reaktionsfolgen wie etwa Proteinsynthese, RNA-Synthese, Fettsäuresynthese, so fällt auf, daß sie häufig von Multienzymkomplexen katalysiert werden. Es ist gut verständlich, daß ein so komplizierter Vorgang wie die Verdoppelung des genetischen Materials nicht von einem einzelnen Enzym, der DNA-Polymerase, vermittelt wird.

Am besten untersucht ist dieser Mechanismus der DNA-Replikation an Viren und anderen relativ einfachen Systemen. Da DNA-Polymerasen nur in 5' → 3' Richtung synthetisieren, die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix aber antiparallel angeordnet sind, kann nur der "leading"-Strang einer Replikationsgabel vom Enzym kontinuierlich repliziert werden, nicht aber der "lagging"-Strang, wie dies in Abb. 1 dargestellt ist. Als Zwischenprodukte der Synthese werden sogenannte "Okazaki"-Stückchen gefunden, die bei Prokaryonten aus 1000-2000 und bei Eukaryonten aus etwa 200 Nukleotiden bestehen. Die "Okazaki"-Stückchen besitzen am 5' Ende ein kurzes RNA-Stück, die "Initiator-RNA" (i-RNA). Diese bietet ein freies 3'-OH Ende, das die DNA-Polymerasen zum Start der Synthese benötigen. Nach Abbau der i-RNA in Eukaryonten durch RNase H, in Prokaryonten durch Polymerase I und dem Füllen der Lücke durch DNA-Polymerase, werden die Stückchen nach Verknüpfen mittels einer DNA-Ligase zu einem ganzen DNA-Strang. Die i-RNA ist bei Prokaryonten etwa 50-100, bei Eukaryonten etwa 10 Nukleotide lang.

Die Synthese der i-RNA wird nicht durch α -Amanitin gehemmt. Als verantwortliches Enzym für deren Bildung gilt bei E.coli das dna G-Protein (2). Dieses Enzym, Primase genannt, kann neben rNTP- auch dNTP-Vorstufen als Substrat verwenden, woraus geschlossen wird, daß die i-RNA auch Desoxyribonukleotidsequenzen enthalten kann (2).

1.2. DNA-Polymerase in anderen Prozessen

DNA-Polymerasen sind neben der Replikation auch an der Reparatur, der Rekombination, der terminalen Verlängerung von DNA und an der Bildung bestimmter IS-Elemente (3) beteiligt.

In allen Organismen gibt es eine Reihe von Reparaturmechanismen, die auch in den Prokaryonten nur teilweise verstanden sind. Mutanten mit veränderter Fähigkeit zur Reparatur von DNA sind in der Gruppe der Säuger nur vom Menschen bekannt (4).

Endonukleasen brechen an der Stelle mit dem erkannten Fehler den DNA-Strang auf, während eine Exonuklease die durch verschiedene Einwirkungen veränderten Basen entfernt. Die entstandene Lücke wird durch DNA-Polymerase wieder gefüllt und mittels der DNA-Ligase ein durch-

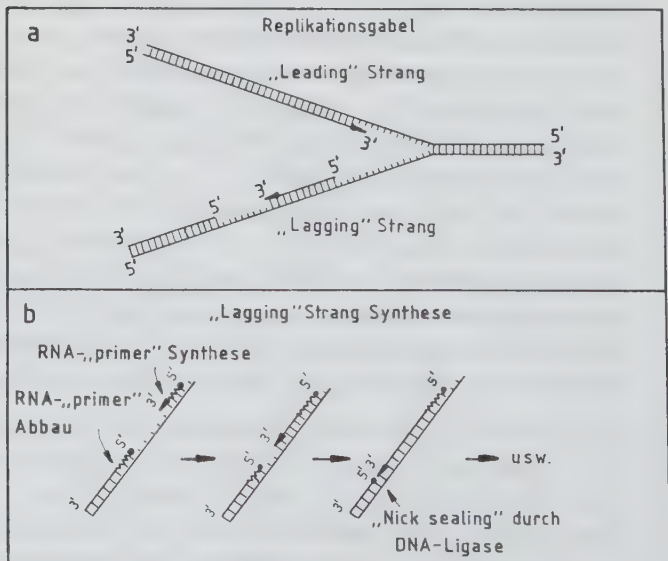


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Replikationsgabel (1)

gehender Strang geknüpft. In jüngster Zeit wurden Befunde publiziert, die vermuten lassen, daß neben der Initiation auch ein Reparaturmechanismus für die Bildung von "Okazaki"-Stückchen verantwortlich sein könnte (2,5,6).

1.3. Reaktionsbedingungen von DNA-Polymerase

Alle DNA-Polymerasen, soweit sie bisher untersucht wurden, haben gleiche grundlegende Bedingungen für die Synthese von DNA: die Anwesenheit von vier dNTP, Mg^{++} - oder Mn^{++} -Ionen und einer Starter-Matrize. Die Polymerisationsreaktion geschieht durch Addition von Desoxynukleotiden an ein 3'-OH Ende eines Initiationsstranges. In einem Übersichtsartikel von Alberts und Sternglanz über Probleme der DNA-Replikation (1) wird postuliert, daß auf Grund der Fähigkeit zur Selbstkorrektur die DNA-Polymerasen einen richtig gepaarten Starter benötigen. Zwei Stufen sind mindestens an der Reaktion beteiligt: 1. Nukleophiler Angriff der 3'-OH Gruppe des Polynukleotidstarters an der α -Phosphatgruppe eines Desoxynukleosidtriphosphates, 2. Translokation des Enzyms zum 3'-OH Ende des neu eingefügten Nukleotids.

Der grundlegende Prozeß der DNA-Synthese dürfte bei allen Organismen der gleiche sein, obwohl die DNA-Polymerasen aus Prokaryonten, niederen und höheren Eukaryonten stark verschieden voneinander sind. Vom Standpunkt der evolutionären Veränderung des DNA-Syntheseapparates erscheint die Untersuchung niederer Eukaryonten notwendig, da sie als Bindeglied zwischen Prokaryonten und höheren Eukaryonten Rückschlüsse auf den Synthesemechanismus zulassen könnten.

An verschiedenen Prozessen, in denen DNA-Synthese vorkommt, sind unterschiedliche DNA-Polymerasen beteiligt. Alle diese Enzyme werden aber im Standardtest auf DNA-Polymerase erfaßt. Zu ihrer Unterscheidung können spezielle Reaktionsbedingungen, genetische Versuche und Komplementierungstests dienen.

1.4. DNA-Polymerasen aus Prokaryonten (7)

Viele Bakterien, wenn nicht alle, besitzen drei Arten von DNA-Polymerasen, der Reihenfolge ihrer Entdeckung nach mit I, II und III bezeichnet. Während lange Zeit geglaubt wurde, die DNA-Polymerase I (Kornberg-Enzym) spiele die entscheidende Rolle in der Replikation, stellte sich später heraus, daß die Polymerase III diese Aufgabe wahrnimmt. Das DNA-Polymerase III-Holoenzym besteht aus vier Untereinheiten (8,9):

Untereinheit	MG	Bezeichnung
α	140 000	DNA-Polymerase III, dnaE-Produkt
β	40 000	Copolymerase III*, DNA EF I
γ	52 000	Komplex aus dna Z-Protein,
δ	32 000	und DNA EF III

Von den DNA-Polymerasen I und II wird angenommen, an der Reparatur von DNA beteiligt zu sein. Die RNA-Starter von diskontinuierlich synthetisierten DNA-Fragmenten werden durch Polymerase I entfernt und die entstehenden Lücken gleichzeitig durch die Polymerasefunktion gefüllt (10). Alle drei DNA-Polymerasen besitzen Exonukleaseaktivität.

1.5. DNA-Polymerasen aus Eukaryonten (11)

Aus der Literatur über eukaryontische DNA-Polymerasen ist zu ersehen, daß sich die Forschung noch in einer deskriptiven Phase befindet. Die Schwierigkeiten liegen vor allem in der sehr viel größeren Komplexität der Systeme und im Fehlen passender Mutanten. Niedere Eukaryonten. z.B. Hefe, Neurospora, Ustilago, Physarum, könnten diesen Mangel beseitigen (12).

In höheren Organismen konnten bisher drei DNA-Polymerasen identifiziert und charakterisiert werden. Ihre Nomenklatur wurde bei einer internationalen Konferenz 1975 in Pacific Grove, Kalifornien, festgelegt (13). Der Reihenfolge ihrer

Entdeckung nach werden sie mit griechischen Buchstaben benannt. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 dargestellt. Bauer und Hofschneider fanden neuerdings eine nicht-virale RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) im Hühnersystem (14). Darüberhinaus sind eine Anzahl virus-induzierter DNA-abhängiger und RNA-abhängiger DNA-Polymerasen beschrieben worden, die einerseits virus-kodiert oder durch Modifikation des Wirtsenzyms durch ein Virusprotein entstanden sein können.

1.5.1. DNA-Polymerase- α

Die höchsten Aktivitäten werden in teilungsaktiven Zellen gefunden, was als Hinweis dafür gewertet werden kann, daß α -Polymerase an der Replikation beteiligt ist (11). Im Einklang mit dieser Annahme steht auch der Befund, daß zwei Entwindungsproteine aus Kalbsthymusdrüsen einen stimulierenden Effekt auf DNA-Polymerase- α , nicht jedoch auf Polymerase- β oder γ ausüben (15). Diese Proteine besitzen ähnliche Eigenschaften wie das Gen 32-Produkt des Phagen T $_4$, von dem bekannt ist, daß es die Aktivität der T $_4$ DNA-Polymerase stimuliert. Merkwürdigerweise findet sich α -Polymerase zum größten Teil im Zytoplasma, was als Hinweis für ein schwach gebundenes Kernprotein gilt, das beim Zellaufschluß aus dem Kern diffundiert.

Diese Vermutung wird durch Befunde unterstützt, in denen bei nicht-wässriger Isolierung der Kerne (16) bzw. bei Cytochalasin-B induzierter Entkernung (17) mehr als 85% der Enzymaktivität im Zellkern gefunden wurde.

In befruchteten Seeigeleiern (18) ergaben sich Hinweise für einen Transport des Enzyms vom Cytoplasma in den Kern bei Beginn der DNA-Synthesephase.

DNA-Polymerase- α zeigt eine Sedimentationskonstante von 6-8 S und ein Molekulargewicht zwischen 120 000 und 300 000 Daltons. Unter Bedingungen mit niedriger Ionenstärke bilden sich Aggregate. Jedoch ist nicht klar, ob es sich um Oligomere handelt oder um Assoziate mit anderen Proteinen, die

Tab. 1: DNA-Polymerasen aus höheren Eukaryonten (11,7)

DNA-Polymerase	α	β	γ
Molekulargewicht	120 000 - 300 000	30 000 - 50 000	150 000 - 300 000
Sedimentationskonstanten (Ionenstärke > 0,15)	6 - 8 S	3,3 S	6,1 - 6,3 S
Hemmung durch N-Äthylmaleinimid	+	-	+
Salzeffekte	Hemmung durch NaCl 25 mM	Stimulierung durch 100-200 mM NaCl Hemmung durch 50 mM Phosphat	Stimulierung durch 100-250 mM KCl und 50 mM Phosphat
Nukleaseaktivität	-	-	-
Starter-Matrizen:	+	+	+
aktivierte DNA	-	++	++
$p(A) \cdot (dT)_{15}$	++	-	++
$p(dT) \cdot (rA)_{10}$	++	++	
$p(dC) \cdot (dG)_{12}$			
pI	< 7	9,2	< 7
pH-Optimum		im Alkalischen	

eventuell an der Replikation beteiligt sind. Proteolyse des nativen Enzyms könnte ebenso für die unterschiedlich auftretenden Formen verantwortlich sein (19).

Aus dem Unterschied der Molekulargewichte, bestimmt durch Gelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation (20), kann auf eine asymmetrische Form des Moleküls geschlossen werden.

SDS-Polyacrylamidelektrophorese einer gereinigten Präparation von DNA-Polymerase- α aus Kalbsthymus zeigt eine Bande entsprechend einem Molekulargewicht von 155 000 (7,3 S, C-Enzym), die mit einer Untereinheit vom Molekulargewicht 50 000-70 000 assoziiert sein kann (8 S; A_1 , A_2 -Enzym) (21). Isolierte α -Polymerase aus menschlichen KB-Zellen zeigt zwei Banden von 76 000 und 66 000 Daltons in äquimolaren Mengen (22).

Charakteristische Eigenschaften der DNA-Polymerase- α sind ihre Sensitivität gegenüber Sulphydrylgruppenblockern wie N-Äthylmaleinimid und p-Hydroxymercuriphenylsulfonat, ihre Hemmung durch NaCl in Konzentrationen über 25 mM, die Abhängigkeit von divalenten Kationen wie Mg^{++} oder Mn^{++} und ihre Unfähigkeit Polyribonukleotid-Matrizen zu replizieren. Sie arbeitet mit Ribo- oder Desoxyribo-Startern und Polydesoxyribonukleotiden als Matrizen wie aktivierter DNA (entstanden durch kurzzeitige Einwirkung von DNase I auf doppelsträngige DNA, um Einzelstrangbrüche und kleine Lücken zu erzeugen), $p(dT) \cdot (rA)_{10}$ und $p(dC) \cdot (dG)_{12}$. Doppelsträngige und einzelsträngige DNA sind unwirksam, wenn nicht durch Nukleaseeinwirkung genügend 3'-OH Gruppen erzeugt werden. Das Reaktionsprodukt von DNA-Polymerase- α mit aktivierter DNA ist doppelsträngige DNA mit "hairpin"-Strukturen (11,23).

α - Polymerasen aus menschlichen Zellen und Kalbsthymus zeigen keine Nukleaseaktivität (23,25), Pyrophosphataustausch wurde beim Kalbsthymusenzym beobachtet (23).

1.5.2. DNA-Polymerase- β

DNA-Polymerase- β ist eine niedermolekulare Spezies (< 50 000) von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit Sedi-mentationskonstanten von 3-4 S. Sie findet sich größten-teils im Zellkern und ihre Aktivität ist gleichmäßig über den Zellzyklus verteilt. Dieser Befund unterstützt die Vorstellung, daß die β -Polymerase nicht unmittelbar an der Replikation beteiligt ist.

Es wurde verschiedentlich gefunden, daß β -Polymerase ein einzelnes Desoxynukleosidtriphosphat in aktivierte DNA einbaut, was nicht von einer Verunreinigung mit einer terminalen Desoxynukleotidyltransferase herrührt, son-dern von einer begrenzten Reparatursynthese an den 3'-OH-Enden (26,27,28). Man fand auch, daß die β -Polymeraseak-tivität in Verbindung mit der Fähigkeit von Zellen an-steigt, UV-induzierte DNA-Synthese auszuführen, was in Phytohaemagglutinin-induzierten Lymphozyten als Hinweis für Reparatursynthese angesehen wird (29)..

Charakteristische Eigenschaften sind die Resistenz gegen Thiol-Reagenzien, die Stimulierung durch 100-200 mM Na⁺, die Hemmung durch 50 mM Phosphat und im Gegensatz zur α -Polymerase die Fähigkeit, auch $p(A) \cdot (dT)_{15}$ als Starter-Matrize akzeptieren zu können.

Auffallend ist die hohe Resistenz gegen eine Anzahl chemi-scher Agentien wie Phosphonoessigsäure (30), 5 M Harn-stoff, 20-25% Äthanol oder Aceton (31) und die Stabilität im pH-Bereich von 4,5-10,5. Das reine Enzym zeigt keine Nukleaseaktivität und katalysiert keinen Pyrophosphat-austausch (31).

Obwohl auch Polyribonukleotid-Matrizen akzeptiert werden, ist der Einbau in Polydesoxyribonukleotid-Matrizen effi-zienter. Eine phylogenetische Studie von L. Chang (94) über das Vorkommen von DNA-Polymerase- β zeigt, daß sie nicht in allen Eukaryonten verbreitet ist, sondern viel-mehr sich auf vielzellige Tiere beschränkt. In Pflanzen,

Protisten und Pilzen wurde ein vergleichbares Enzym bisher nicht gefunden. Als Unterscheidungskriterien zur Polymerase- α und - γ dienen das Molekulargewicht und die Empfindlichkeit gegenüber N-Äthylmaleinimid (10 mM; Vorinkubation 30 min, 4°C).

1.5.3. DNA-Polymerase- γ

DNA-Polymerase- γ hat ein Molekulargewicht von 150 000 - 300 000, eine Sedimentationskonstante von 6,1-6,3 S und ist wie α -Polymerase sensitiv gegenüber Thiolgruppenblockern (50-80% bei 1 mM N-Äthylmaleinimid). Die Aktivität ist optimal bei 100-250 mM KCl und im Gegensatz zur β -Polymerase stimulieren 50 mM Phosphat bei Anwesenheit von KCl das Enzym (32,33). Ähnlich der β -Polymerase kann die γ -Polymerase Ribohomopolymere als Matrize verwenden, im Falle von p(A) sogar 5-10 mal besser als p(dA). Dieser Vorzug von Ribohomopolymeren gegenüber Desoxyribohomopolymeren ist eine charakteristische Eigenschaft der γ -Polymerase.

Der Verdacht lag deshalb nahe, es könnte sich dabei um eine virale reverse Transkriptase handeln. Indes wird natürliche RNA, ein Substrat der reversen Transkriptase, von der γ -Polymerase nicht akzeptiert. Auch immunologische Studien (34,35) zeigten die Verschiedenheit beider Enzyme. Ein weiterer Unterschied besteht bei der Verwendung von Poly(2'-O-methylcytidylat) als Matrize. DNA-Polymerase- γ kann es nicht kopieren, dagegen ist es bei jeder RNA-Tumovirus-induzierten RNA-abhängigen DNA-Polymerase eine wirksame Matrize (36).

Wie die α - und β -Polymerase, so zeigt auch die γ -Polymerase eine Heterogenität bei der Isolierung (32,33,34,37).

1.5.4. Mitochondriale (mt)-DNA-Polymerase

Aus früheren Arbeiten wurde geschlossen, daß Mitochondrien und eventuell auch andere zelluläre Organellen eine eigene

DNA-Polymerase verschieden von den drei anderen zellulären Polymerasen besitzen. Neuere Untersuchungen an HeLa-Zellen, Rattenhirn und Hühnerembryonen (38,39,40) zeigen jedoch, daß die mitochondriale DNA-Polymerase identisch mit der DNA-Polymerase- γ ist.

Nach diesen Ergebnissen reduziert sich die Zahl der bekannten DNA-Polymerasen aus Wirbeltieren von ursprünglich vier auf drei.

1.6. DNA-Polymerasen aus niederen Eukaryonten (41)

Von DNA-Polymerasen aus Prokaryonten und höheren Eukaryonten, insbesondere aus Wirbeltieren, sind viele Eigenschaften und Funktionen bekannt, so daß ein klares System der DNA-synthetisierenden Enzyme angegeben werden konnte. Bei den niederen Eukaryonten sind von gereinigten Enzymen kaum Daten und Eigenschaften bekannt. Die DNA-Polymerase von *Ustilago maydis* zeigt in der SDS-Elektrophorese zwei Banden mit den Molekulargewichten 50 000 und 55 000 (42). Dieses Enzym besitzt eine 3'→5' Exonukleaseaktivität (43). Die gefundenen Eigenschaften bei Enzymen aus Pflanzen, Protisten und Pilzen lassen sich in das System der DNA-Polymerasen aus höheren Eukaryonten nicht mühelos eingliedern.

Eine Erklärung für die markanten Unterschiede könnte angegeben werden, wenn man annimmt, daß sich auch der DNA-synthetisierende Prozeß möglicherweise in Richtung zunehmender Genomkomplexität phylogenetisch verändert hat. DNA-Polymerasen aus Pflanzen, Protisten und Pilzen sind hochmolekular und häufig mit einer Exonukleaseaktivität assoziiert, wohingegen kein Enzym aus Wirbeltieren Desoxyribonukleaseaktivität besitzt. In keinem dieser Organismen konnte ein der β -Polymerase entsprechendes Enzym gefunden werden. Das Fehlen der β -Polymerase und das Vorhandensein von Nukleaseaktivität könnte in Zusammenhang stehen.

1.7. Modellorganismus *Physarum polycephalum*

Physarum polycephalum gehört zu den Myxomyceten, die im System der Lebewesen nach Whittaker (44) zwar den Pilzen zugeordnet sind, aber dennoch eher eine Stellung zwischen Pilzen, Tieren und Protisten einnehmen: "The slime molds cross the distinction of the kingdoms in both nutrition and organisation, and offer a free choice of treatment as aberrant fungi, eccentric protists, or very peculiar animals" (44). In der Morphologie des Fruchtkörpers und der Sporenbildung ist er ähnlich den Pilzen, jedoch hinsichtlich der Art der Ernährung, des Vorkommens von Zellwänden und der Organisation der Flagellen stark verschieden von ihnen. Verschiedene Autoren neigen mehr zur einen oder anderen Seite. Einige Besonderheiten lassen *Physarum polycephalum* als geeignetes Untersuchungsobjekt und Modellsystem erscheinen.

- a) *Physarum polycephalum* hat einen kurzen Wachstumszyklus und kann auch in großen Fermentern gezüchtet werden.
- b) Im Stadium der Amöben ist eine genetische Analyse möglich.
- c) Die Plasmodien haben einen synchronen Zellzyklus (Synchroniegrad > 95%) und eine synchrone Differenzierung.
- d) Es gibt ausgearbeitete Methoden zur Isolierung von Zellorganellen und zur Extraktion von Makromolekülen.

1.8. Zellzyklus von *Physarum polycephalum*

Der Zellzyklus in Plasmodien von *Physarum polycephalum* dauert von Mitose zu Mitose etwa 10 Stunden. Die Kernteilung beginnt 15-20 min vor der Metaphase mit der Auflösung der Nukleoli in den etwa 10^8 diploiden Kernen eines Makroplasmodiums. Die in der Äquatorialplatte an-

geordneten Metaphasechromosomen werden ohne Auflösung der Kernmembran in der darauffolgenden Ana- und Telo- phase auf die Tochterkerne verteilt.

Im Anschluß an die Telophase beginnt in logarithmisch wachsenden Plasmodien sofort die DNA-Replikation (S-Phase), die drei Stunden dauert.

Für den Aktivitätsverlauf von Enzymen im Zellzyklus gibt es mindestens vier unterschiedliche Muster (45):

- a) Gipfelenzyme (Thymidinkinase, DNA-Polymerase, NAD-Pyrophosphorylase) zeigen einen Aktivitätsgipfel, hervorgerufen durch Instabilität oder Inaktivierung des Enzyms.
- b) Schritzenzyme (Ribonuklease, Glutamatdehydrogenase, Poly(ADP-ribose) polymerase) verdoppeln zu einer bestimmten Zeit im Zellzyklus ihre Aktivität, vermutlich durch zeitlich begrenzte Neusynthese.
- c) In ihrer Aktivität kontinuierlich ansteigende Enzyme (Thymidinmonophosphatkinase u.a.) erscheinen stabil und werden vermutlich während des ganzen Zellzyklus synthetisiert.
- d) Zwei instabile Enzyme (Ornithindecaboxylase, S-Adenosyl-1-Methionindecaboxylase) zeigen Aktivitätsverdoppelung, wahrscheinlich infolge erhöhter Synthesegeschwindigkeit.

1.9. DNA-Polymeraseaktivität im Zellzyklus (46,47)

Der Verlauf der DNA-Polymeraseaktivität in isolierten Kernen und im Gesamthomogenat ist unterschiedlich. In isolierten Kernen steigt die Aktivität nach der Metaphase sprunghaft auf den Maximalwert an. Spätestens drei Stunden vor der nächsten Mitose liegt sie wieder auf dem niedrigen G₂-Phase-Niveau (s. Abb. 2). Im Gesamthomogenat jedoch kann bereits 30 min vor der Metaphase eine erhöhte Polymeraseaktivität gemessen werden. Das Minimum liegt 2-3 Stunden vor der Mitose.

Der plötzliche Anstieg in der Kernfraktion legt die Vermutung nahe, daß das Enzym während der S-Phase stärker in den Kernen gebunden ist und bei der Isolierung entsprechend weniger Enzymmaterial verloren geht. Der bereits 30 min vor der Metaphase gemessene Anstieg der Aktivität im Gesamthomogenat muß nicht Neusynthese des Enzyms bedeuten. Aktivierung bereits vorhandener Enzymmoleküle oder unterschiedliche Wirksamkeit von Inhibitoren könnte ebenso die Ursache sein. An synchronisierten Hefezellen konnte gezeigt werden, daß die Schwankungen der DNA-Polymeraseaktivität im Zellzyklus weder durch periodischen Abbau und Neusynthese des Enzyms noch durch reversible Änderungen der Größe der Polymerase hervorgerufen werden (48).

Die Titration der Enzymmoleküle mit spezifischen Antikörpern wäre ein Weg zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden.

Zur Erzeugung spezifischer Antikörper ist jedoch ein reines Enzym notwendig. Auch zur Klärung der Enzymologie der DNA-Replikation in niederen Eukaryonten kann die Reinigung und Charakterisierung dieser DNA-Polymerase einen wichtigen Beitrag leisten.

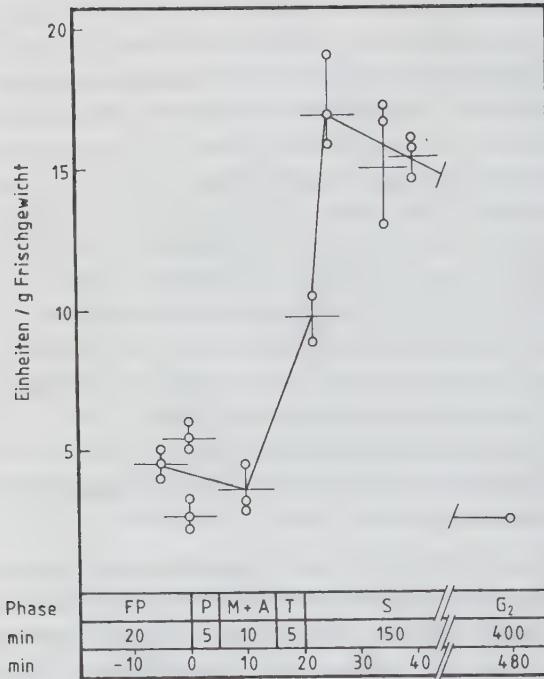


Abb. 2: DNA-Polymeraseaktivität in isolierten Kernen aus Plasmodien von *Physarum polycephalum* (46). Der Übergang von der frühen Prophase zur Prophase, der morphologisch im Mikroskop gut sichtbar ist, wird als Zeitpunkt 0 gewählt. In der ersten Zeile sind die Phasen im Zellzyklus angegeben (FP: frühe Prophase; P: Prophase; M: Metaphase; A: Anaphase; T: Telophase); in der zweiten Zeile die Dauer der einzelnen Phasen in min; in der dritten Zeile die Zeitskala relativ zum Übergang frühe Prophase-Prophase. Die waagerechten Striche durch die Meßwerte geben die Zeitungenauigkeit der Entnahme der Plasmodien an.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Geräte:

Braun Mixer MX 32, Braun (Frankfurt)
Potter-Homogenisator, Typ 853202, Braun (Melsungen)
Autoklav pulsmatic, euroclinic (München)
Querstrombank Typ CF 400, CEAG Concordia Elektrizitäts-
gesellschaft (Dortmund)
Schüttelmaschine, New Brunswick, Modell R-7, Biotronik
(München)
Schüttelmaschine, Typ Sm6, Edmund Buchler (Tübingen)
IEC/B 60 Ultrazentrifuge, Biotronik (München)
IEC/PR-6000 Zentrifuge, Biotronik (München)
Stock-Zentrifuge, Fa. Stock (Marburg)
WKF Zentrifuge, WKF (Brandau/Darmstadt)
MSE High Speed 18 Zentrifuge, Haake (Karlsruhe)
Minifuge 2, Heraeus-Christ (Osterode/Harz)
LKB Ultrorac Fraktionssammler, LKB (Gräfelfing)
LKB 12 000 Varioperpex Peristaltikpumpe, LKB (Gräfelfing)
Infusionspumpe Typ 871102, Braun (Melsungen)
Kälte-Kleinthermostat K4R, Meßgerätewerk Lauda (Lauda)
LKB 2103 Power Supply, LKB (Gräfelfing)
Elektrophoreseapparatur für Röhrchen und Platten (130 x
150 x 1.5 mm), Eigenbau, MPI für Biochemie (Martinsried)
E-C Elektrophoreseapparatur, E-C Apparatus Corp.
(Philadelphia)
Cenco Rotary Mixer, Cenco Instrumenten (Breda, Niederlande)
Soft laser scanning Densitometer, Biomed Instruments, Inc.
(Chicago, Illinois)
UV-Lampe, Original Hanau NN 30/89 Sterisol F 1137 L5,
Hanau Quarzlampen (Hanau)
Isco UA 5 Absorbance Monitor, Colora (München)
Isco Type 6 Optical unit, Filter 280 nm, Colora (München)
Beckman DB Spektralphotometer, Beckman Instruments GmbH
(München)

Zeiss MQ3 Spektralphotometer, Carl Zeiss (Oberkochen)
pH-Meter PHM 26, Radiometer (Kopenhagen)
Leitfähigkeitsmeßgerät Digi LF, Wiss.-Techn. Werk-
stätten (Weilheim)
Intertechnique SL 30 Flüssigkeitsszintillationszähler,
Deutsche Intertechnique GmbH (Mainz)
Intertechnique Multi 8 Computer, Deutsche Intertechnique
GmbH (Mainz)
Aerolith Filtersteine (120 mm lang; Durchmesser 30 mm außen
15 mm innen; Körnung 20; eine Seite geschlossen),
Schumacher'sche Fabrik (Bietigheim/Württ.)
Membranfilter (5 cm Durchmesser), Sartorius (Göttingen).

2.2. Verwendete Chemikalien:

Amersham-Buchler, Braunschweig:

(Methyl-³H)-2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat als
Ammoniumsalz in 50% Äthanol (30 Ci/mMol)

BASF, Ludwigshafen
Polymin P

Behringwerke, Marburg
Rinder Serumalbumin

Boehringer, Mannheim

ATP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, p(A)·(dT)₁₂, p(dA)·(dT)₁₂
Dithiothreitol (Cleveland's Reagents),
Alkoholdehydrogenase (Hefe), Alkoholdehydrogenase
(Pferdeleber), DNase I (Rinderpankreas) Reinheitsgrad
Katalase (Rinderleber), Ferritin (Pferdemilz),
β-Galaktosidase (E.coli), Pyruvat-Kinase (Kaninchen-
muskel), Laktatdehydrogenase (Schweineherz),
Fumarase (Schweineherz), Phosphorylase a (Kaninchen-
muskel), Aldolase (Kaninchenmuskel)

Brenntag GmbH, Mühlheim
Niach Polyol LHT 67

Calbiochem, Lahn
DNA (Lachssperma) Na-Salz, Grade A

Collaborative Research, Waltham, Mass.
p(dA)·(rU)₁₂₋₁₈

Difco, Otto Nordwald K.G., Hamburg
Bacto-Tryptone, Bacto-Yeast-Extract

Fluka A.G., Buchs SG
Hämin(chlorid)

LKB, Gräfelfing
Ampholine pH 3.5-10, 4-6, 5-7, 9-11, Ultrogel AcA 34

Merck, Darmstadt
N-Äthylmaleinimid, Phenylmethan-sulfonylfluorid,
Pyridoxalphosphat, Pyridoxaminphosphat,
Pyridoxol · HCl, Pyridoxal · HCl

Pharmacia, Freiburg
DEAE-Sephacel, DEAE-Sephadex A 25, Sepharose CL 6B,
BrCN-Sepharose 4B, Dextranblau

Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoäthanol

Serva, Heidelberg
DNA (Lachssperma), Ovalbumin, Aldolase (Kaninchen-
muskel), Cellulose Ionenaustauscher: Typ P; Typ
DEAE SS, Ammediol, Thioglycolsäure Na-Salz, EGTA,
Ethidiumbromid, Chlorhexidin-diacetat, Acrylamid,
N,N'-Methylenbisacrylamid, TMED, o-Nitrophenyl-β-
galaktopyranosid, Coomassie Brilliant Blue R-250,
Polyäthylenglycol 20 000

Sigma, München
Ammediol, Thyroglobulin (Schwein), Heparin,
Novobiocin Na-Salz, MOPS

Union Carbide Corporation, Chicago, Illinois
Dialysesschläuche

Whatman, Vetter K.G., Wiesbaden
Cellulose CF 11, GF/C-Filter

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt,
bezogen und waren von pro analysi Qualität.

Unter der Angabe "Wasser" ist destilliertes Wasser zu
verstehen.

2.3. Abkürzungen:

Ammediol	2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
C	Celsius
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNase I	Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dTMP	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
EDTA	Äthylendiamin-N,N'-tetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis(2-aminoäthyläther)N,N'-tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
[³ H] dTTP	(Methyl- ³ H)-2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
Ipm	Impulse/Minute
min	Minuten
MOPS	Morpholino-propan-sulfonsäure
p(A)·(dT) ₁₂	Poly-adenylsäure · Dodeca-desoxy-thymidylsäure
p(dA)·(dT) ₁₂	Poly-desoxy-adenylsäure · Dodeca-desoxy-thymidylsäure
p(dA)·(rU) ₁₂₋₁₈	Poly-desoxy-adenylsäure · Oligo-uridylsäure
PCA	Perchlorsäure
PEG	Polyäthylenglycol 20 000
PMSF	Phenylmethan-sulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxazol
TCA	Trichloressigsäure
TMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
s	Sekunden
S	Svedberg-Einheit (10 ⁻¹³ s)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Upm	Umdrehungen/Minute

2.4. Medium und Puffer

N + C Medium (49)

	mM	g/1000 ml
Bacto-Tryptone		10
Bacto-Yeast-Extrakt		1,5
Glukose	61,1	11,0
Zitronensäure • H ₂ O	16,8	3,54
Eisen(II)sulfat • 7 H ₂ O	0,3	0,004
Kaliumdihydrogenphosphat	14,7	2,0
Calciumchlorid • 2 H ₂ O	4,1	0,6
NMZ-Lösung		10 ml

Mit 1 N Natronlauge wird auf pH 4,6 eingestellt und bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

NMZ-Lösung

	mM	g/100 ml
Magnesiumsulfat • 7 H ₂ O	243	6,0
Manganchlorid • 4 H ₂ O	42	0,84
Zinksulfat • 7 H ₂ O	12	0,34

Häminlösung

Hämin(chlorid)	0,05 g
1 N NaOH	25 ml
Wasser ad	100 ml

Die autoklavierten Lösungen von Hämin und N+C-Medium werden vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 zum N+C+H-Medium gemischt. Hämin und N+C-Medium müssen getrennt autoklaviert werden, da Hämin beim pH des Mediums während der Sterilisation ausfallen würde.

Puffer 1 50 mM Tris • HCl pH 7,5
 250 mM Saccharose
 10 mM Magnesiumacetat • $\frac{1}{4}$ H₂O
 5 mM β -Mercaptoäthanol

Puffer 2 50 mM MOPS • KOH pH 7,5
 0,3 mM EDTA Dinatriumsalz
 2 mM β -Mercaptoäthanol
 20% (V/V) Glycerin

Puffer 3 50 mM Tris • HCl pH 7,5
 0,3 mM EDTA Dinatriumsalz
 2 mM β -Mercaptoäthanol
 20% (V/V) Glycerin

2.5. Einengen von Proteinlösungen

Die einzuengenden Proteinlösungen wurden in entsprechende Dialyseschläuche gefüllt und in einer Petrischale oder Plastikwanne (bei Volumen bis zu 1 l) mit $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ der Flüssigkeitsmenge PEG 20 000 umgeben. War der gewünschte Einengungsgrad erreicht, wurde der Schlauch außen mit kaltem Leitungswasser von anhaftendem PEG befreit, mit der verbliebenen Lösungsmenge die innere Oberfläche gespült und nach dem Aufschneiden und Entleeren die restliche an den Wänden haftende Flüssigkeit durch Zusammendrehen des Schlauches herausgedrückt.

Wurden nur 10% der Lösungsmenge an PEG verwendet, ließ sich bei Einengung über Nacht das vollständige Eintrocknen verhindern.

2.6. Ammoniumsulfat-Fällung

Ammoniumsulfat-Fällung wurde nur als erster Schritt in der Anreicherung verwendet. Wegen der Pufferkapazität des Proteins im Homogenat konnte das feste Salz zugegeben werden. Die pH-Verschiebung konnte unberücksichtigt bleiben. Die Berechnung der zuzugebenden Menge Ammoniumsulfat erfolgte nach Literaturangaben (50), wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

Tab. 2: Gesättigte Lösungen von Ammoniumsulfat in Wasser bei verschiedenen Temperaturen

Temperatur °C	0	10	20	25	30
G	514,72	525,05	536,34	541,24	545,88
V	0,5262	0,5357	0,5414	0,5435	0,5458
$\frac{V \cdot G}{1000}$	0,271	0,281	0,290	0,294	0,298

$$X = \frac{0,1 \text{ G } (S_2 - S_1)}{1 - \frac{V \cdot G}{1000} S_2}$$

X: Gramm Ammoniumsulfat, die zu 100 ml einer Lösung der Sättigung S_1 gegeben werden muß, und die Sättigung S_2 zu erreichen.

G: Gramm Ammoniumsulfat in 1000 ml einer gesättigten Lösung

V: scheinbares spezifisches Volumen von Ammoniumsulfat in gesättigter Lösung.

Nach dem vollständigen Lösen des Ammoniumsulfates wurde bis zum Abzentrifugieren des Niederschlags noch mindestens 1/2 Stunde gerührt.

2.7. Polymin P Fällung

In einigen Aufarbeitungen präparativen Maßstabs wurden die Zellkerne durch 10 mM EDTA lysiert (51). Die dabei in Lösung gegangene DNA ließ sich mit Polymin P leicht und quantitativ fällen (52).

Von Polymin P wird eine etwa 10%ige wässrige Lösung hergestellt und mindestens 12 Stunden gegen Wasser dialysiert. Danach wird der pH mit 1 N HCl auf 9-10 eingestellt. Zum Lysat gibt man unter ständigem Rühren soviel Polymin P Lösung zu, bis eine Konzentration von 0,3% erreicht ist. Man rührt noch eine halbe Stunde und zentrifugiert dann den Niederschlag ab (2000-3000 Upm, Stock-Zentrifuge).

Polymin P wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Palm (Abt. Prof. Zillig) zur Verfügung gestellt.

2.8. Präparation von DNA-Cellulose

DNA-Cellulose wurde in Anlehnung an die Methode von Weissbach und Poonian (53) hergestellt.

Die Cellulose (Whatman CF 11) suspendiert man in 15 ml 1 N Salzsäure/g und rührt 10 min lang. Man filtriert durch eine Nutsche ab und wäscht mit Wasser nach. In 15 ml 1 N Salzsäure/g wird die Cellulose erneut aufgeschwemmt und 10 min lang gerührt, abfiltriert und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Danach läßt man die Cellulose lufttrocknen.

Doppelsträngige DNA (Lachssperma, Calbiochem) wird in einer Konzentration von 2 mg/ml in 10 mM KCl durch mehrtägiges Stehenlassen gelöst. 1 g Cellulose mischt man mit 8 ml der DNA-Lösung, gießt diesen Brei in eine Wanne und läßt im Luftstrom trocknen. Die DNA-Cellulose wird mit absolutem Äthanol angefeuchtet; größere Stücke werden in einer Reibschale mit dem Pistill zerkleinert. Man gibt noch soviel absoluten Äthanol zu bis die Suspension mit einem Magnetrührer gut gerührt werden kann. Danach be-

strahlt man mit einer Quecksilber-Niederdrucklampe (254 nm; Original Hanau NN 30/89 Sterisol F 1137 L5) unter vorsichtigem Rühren 30 min lang im Abstand von 50 cm (entsprechend etwa 10^4 J/m^2). Durch eine Nutsche wird das Äthanol abgesaugt und die DNA-Cellulose dreimal gewaschen, indem man sie mit 7 ml/g 1 mM KCl 10 min lang rührt. Man läßt an der Luft trocknen und kann sie dann bei Raumtemperatur aufbewahren.

Um die an der Cellulose adsorbierte DNA zu bestimmen, wurden die Waschflüssigkeiten gesammelt und darin die DNA nach der Methode von Burton gemessen. Über 90% der DNA waren adsorbiert worden.

Es erwies sich als günstig, vor Gebrauch einer mit neuer DNA-Cellulose gefüllten Säule mit der höchsten im Säulenlauf vorkommenden Salzkonzentration einmal zu waschen, um die unter diesen Bedingungen eluierbaren DNA-Anteile zu entfernen.

2.9. Präparation von einzelsträngiger DNA-Cellulose

Einzelsträngige DNA wurde durch 10 min langes Erhitzen auf 80°C und darauffolgende rasche Abkühlung hergestellt. Präpariert wurde einzelsträngige DNA-Cellulose nach obiger Vorschrift unter Weglassen der Bestrahlung mit UV-Licht.

2.10. Präparation von Dextranblau-Sepharose 4B

Bromycan-aktivierte Sepharose 4B wurde nach der Präparationsanleitung der Fa. Pharmacia in 200 ml/g Gel 1 mM Salzsäure 15 min lang auf einem Glasfilter gequollen und gewaschen. Das Kuppeln von Dextranblau erfolgte nach einer Vorschrift von Ryan und Vestling (54) in Anlehnung an die Bedingungen von Cuatrecasas (55).

Dextranblau wird in einer Konzentration von 20 mg/ml in 0,4 M Natriumcarbonatpuffer pH 9-10 gelöst (29 ml 0,4 M

Natriumcarbonat + 71 ml 0,4 M Natriumhydrogencarbonat entspricht einem pH von 9,6). 1 ml dieser Lösung gibt man zu 1 ml BrCN-Sepharose 4B Gel. Nach einer pH-Kontrolle mischt man bei 4°C 16-20 Stunden oder bei Raumtemperatur 2-3 Stunden langsam in einem Rotationsmischer. Rühren mit einem Magnetstab sollte nach Möglichkeit vermieden werden, um die Gelkörner nicht zu zerstören. Das Gel wird dann mit 1 l 1 M KCl/10 ml Gel auf einer Glasfritte gewaschen.

Aus der Waschflüssigkeit wurden durch Extinktionsmessung bei 630 nm die nichtgebundenen Dextranblauanteile bestimmt. In zwei Präparationen wurden einmal 37% und einmal 35% gebunden. Die Aufbewahrung von Dextranblau-Sepharose 4B erfolgte in Puffer 2 bei 4°C. Im Laufe der Zeit wurde langsam etwas Dextranblau freigesetzt.

2.11. Präparation von Heparin-Sepharose 4B

BrCN-aktivierte Sepharose 4B wurde nach der Präparationsanleitung der Fa. Pharmacia in 200 ml 1 mM HCl/g Gel 15 min lang auf einem Glasfilter gequollen und gewaschen. Das Kuppeln erfolgte nach einer Vorschrift von Iverius (56).

1 ml BrCN-aktiviertes Sepharose 4B Gel wird in 1 ml einer Lösung von 2 mg Heparin pro 1 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonat suspendiert und im Rotationsmischer bei 4°C 16-20 Stunden gemischt. Danach gibt man pro 100 ml dieses Ansatzes ($\pm$ 50 ml Gel) 0,6 ml Äthanolamin zu und mischt noch eine weitere Stunde. Über einer Glasfritte wird das Gel abgesaugt und bei 4°C sukzessive mit 500 ml Wasser, 250 ml 0,5 M Natriumchlorid und 1,5 l Wasser gewaschen.

Heparin-Sepharose 4B wurde in Puffer 2 bei 4°C aufbewahrt.

2.12.1. Kalibrierung analytischer Gelfiltrationssäulen

Analytische Gelfiltration von DNA-Polymerase zur Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichtes bzw. des

Stokesschen Radius (57,58) wurden an Sepharose CL 6B oder Ultrodex AcA 34 Säulen (1,5 x 70 cm) äquibriert bei 4°C mit 0,4 M KCl, 0,8 M KCl oder 0,4 M KCl + 1,6 M Harnstoff in Puffer 2 ausgeführt. Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und ihr Volumen durch Wiegen jedes Gestells mit 10 Gläsern bestimmt, um daraus das Elutionsvolumen V_e einer Substanz zu ermitteln. Die Durchflußgeschwindigkeit war 8-9 ml/Stunde.

Das Ergebnis einer Gelfiltration kann in einem Verteilungskoeffizienten, dem K_d -Wert ausgedrückt werden (59).

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \qquad V_i = V_t - V_o$$

V_e = Elutionsvolumen

V_o = Ausschlußvolumen, bestimmt mit Dextranblau

V_t = Elutionsvolumen von Saccharose

Die Säule wird mit Eichproteinen kalibriert (s. Abb. 3). Trägt man die Stokesschen Radien (57,58) gegen $K_d^{1/3}$ auf, so erhält man eine Gerade (60), mit deren Hilfe man die Stokesschen Radien der DNA-Polymerase bestimmen kann.

Eine einfachere Art der Auftragung ist die des Elutionsvolumens V_e gegen den Logarithmus des Molekulargewichts (58). Den Vorteilen der einfacheren Auftragung und der schnelleren Kalibrierung (die Bestimmung von V_o und V_t kann wegfallen), stehen die Nachteile gegenüber, daß zwei Elutionsvolumen V_e aus verschiedenen Säulen nicht direkt miteinander verglichen werden können und die abgelesenen Molekulargewichte nur für globuläre Proteine gelten.

Zur schnelleren Ausrechnung von K_d -Werten wurde ein Programm für einen Multi 8 Computer (Intertechnique) entwickelt (s. Abschnitt 2.12.2.).

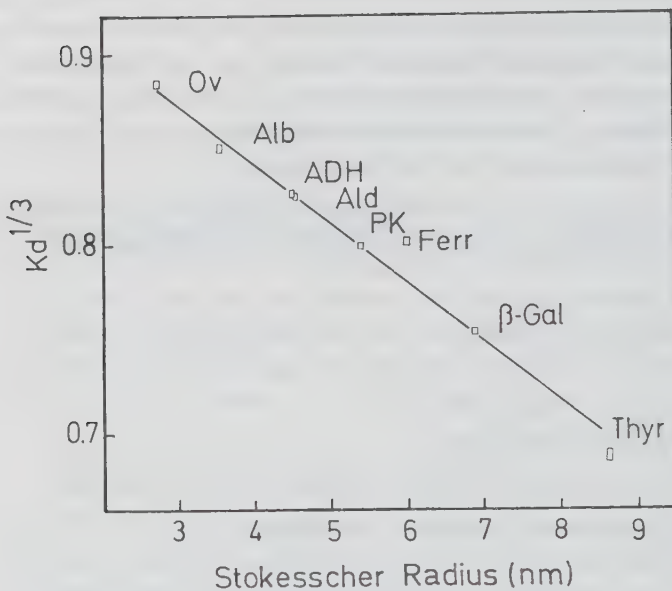


Abb. 3: Stokessche Radien der Eichproteine. Folgende Markerproteine wurden zur Kalibrierung der Sepharose CL 6 B Säule verwendet. In Klammern sind die Stokesschen Radien in nm angegeben: Ovalbumin (2,73); Albumin (3,55); Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe (4,5); Aldolase (4,6); Pyruvat-Kinase (5,4); Ferritin (6,0); β-Galaktosidase (6,9); Thyroglobulin (8,6). Die Maxima sind durch Aufschreibung der Absorption bei 280 nm mit einem ISCO UA5 Absorbance Monitor gemessen worden. Mindestens zwei Säulenläufe für jedes Markerprotein wurden durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch die Höhe der Symbole dargestellt.

2.12.2. Programm zur Berechnung von K_d -Werten.

Als Programmiersprache diente das LEM-System

```
MONITOR LEM,LP?2
PROGRAM
```

```
$ZERO
#330.OLP 2
```

```
MONITOR LEM,LP?2
PROGRAM
```

```
$JDS
$LIST
5.000PNI'PROGRAMM FUER KAV, 2. WURZEL -LOG KAV, KD, 3. WURZEL KD'2†
10.00REDK'WERTEANZAHL'K2,K1,K†
15.00REDK'VOID VOL'K4,K4,K†
20.00REDK'IDIAL VOL'K3,K3,K†
25.00REDK'VE SUCHDSE'K2,K2,K3†
30.00PNI'ELUTIONSVOL'4@'KAV'4@'2. WURZEL -LOG KAV'4@'KD'4@'3. WURZEL KD'
31.00PNI3†
35.00REDK2@,KM1
40.00X=B-A
45.00Y=M1-A/X
50.00Z=FLGY
55.00X=Z/2.3026
60.00W=O-X
65.00X=FCW
70.00Z=C-A
75.00W=M1-A/Z
80.00Z=FLGw
85.00N=Z/3
90.00Z=FCXN
95.00PNI5@6Y,6@6X,10@6W,6@6Z,2†
100.0<I,35
105.0HLI
955.0@
```

2.12.3. Berechnung der K_d -Werte mit Hilfe des in 2.12.2. dargestellten Programms.

K_{av} kann auch anstelle von K_d verwendet werden und ist wie folgt definiert:

$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_s - V_o)$, wobei V_s das Totalvolumen der Säule ist, das leicht aus ihren geometrischen Abmessungen berechnet werden kann.

Die abgedruckten Werte sind Mittelwerte der Bestimmungen mit folgenden Proteinen: (1) Cytochrom c, (2) Ovalbumin, (3) Albumin, (4) Fumarase, (5) Alkohol-Dehydrogenase, (6) Aldolase, (7) Pyruvat-Kinase, (8) Ferritin, (9) β -Galaktosidase (Boehringer), (10) β -Galaktosidase (Sigma), (11) Thyroglobulin, (12) (13) (14) DNA-Polymerase aus Physarum polycephalum Form A, B und C.

MONITOR LEM,LP?2
PROGRAM

\$G05

\$EX

4097

PROGRAMM FUER KAV, 2. WURZEL -LOG KAV, KD, 3. WURZEL KD

WERTEANZAHL ?14

VOID VOL ?41.4

TOTAL VOL ?123

VE SUCROSE ?1117.7

ELUTIONSVOL	KAV	2. WURZEL -LOG KAV	KD	3. WURZEL KD	
?105.3	0.7830	0.3258	0.8374	0.9425	(1)
?94.27	0.6479	0.4341	0.6929	0.8849	(2)
?88.46	0.5767	0.4889	0.6167	0.8512	(3)
?84.00	0.5220	0.5312	0.5583	0.8234	(4)
?84.60	0.5294	0.5255	0.5661	0.8272	(5)
?84.40	0.5269	0.5274	0.5635	0.8260	(6)
?80.28	0.4764	0.5674	0.5095	0.7987	(7)
?80.66	0.4811	0.5636	0.5145	0.8013	(8)
?74.15	0.4013	0.6296	0.4292	0.7543	(9)
?71.10	0.3639	0.6625	0.3892	0.7301	(10)
?66.25	0.3045	0.7185	0.3256	0.6880	(11)
?75.46	0.4174	0.6159	0.4463	0.7642	(12)
?80.11	0.4743	0.5690	0.5073	0.7975	(13)
?83.80	0.5196	0.5332	0.5557	0.8221	(14)

2.13. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten

Lineare 5-20% (w/v) Saccharose-Gradienten wurden in Polypropylenröhrchen hergestellt durch Mischen von 1,7 ml der 20%igen Lösung mit 1,9 ml der 5%igen in einem Gradientenmischgefäß (61). Die Saccharose wurde in Puffer 2 mit 0,4 M KCl oder 0,8 M KCl gelöst. 200-250 µl Enzymlösung, die β -Galaktosidase (15,9 S), Katalase (11,3 S) und Rinderserumalbumin (4,3 S) als Marker enthielt, wurden auf die Gradienten aufgetragen. Die Sedimentation wurde in einem IEC SW 60 Rotor bei 3°C, 58 000 Upm für 16 Stunden ausgeführt. Nach dem Lauf wurden die Röhrchen entleert, indem eine stumpfe Nadel von oben auf den Boden des Röhrchens geführt und der Inhalt in ca. 30 Fraktionen zu je 3 Tropfen gesammelt wurde.

In späteren Versuchen wurden dann lineare 10-30% (w/v) Glyceringradienten in glycerinfreiem Puffer 2 mit 0,4 M KCl oder mit 0,4 M KCl + 1,6 M Harnstoff verwendet. Die Auftragspräparation wurde zuvor 4-5 Stunden gegen Puffer 2 ohne Glycerin dialysiert. Zu 200 µl der Enzymlösung wurden 5 µl einer Katalase Verdünnung (10 µl Kristallsuspension + 40 µl Puffer 2), 10 µl Laktat-Dehydrogenase (6,9 S) und 40 µl Alkohol-Dehydrogenase (4,9 S) gegeben und das Ganze nach dem Mischen vorsichtig auf einen Gradienten aufgetragen. Der 16-stündige Sedimentationslauf wurde in einem IEC SW 60 Rotor bei 3°C und 48 000 Upm ausgeführt. Die Markerenzyme wurden enzymatisch in einem optischen Test bestimmt.

2.14. Züchtung von Physarum polycephalum

Physarum polycephalum, Stamm M_{3c}, wurde nach den Methoden von Daniel, Rusch und Baldwin (49,62) kultiviert.

2.14.1. Mikroplasmodien in konventionellem Maßstab

Aus einer dicht gewachsenen Schüttelkultur werden alle 2 Tage 2,5 ml Mikroplasmodien in eine 500 ml Schüttelflasche mit 100 ml N+C+H-Medium transferiert und bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Etwa 2-3 Tage nach dem Transfer kann geerntet werden.

2.14.2. Mikroplasmodien in großer Menge

Die Ausbeute an Mikroplasmodien aus 20-25 Schüttelflaschen mit je 100 ml Medium beträgt etwa 150-200 Gramm. Um DNA-Polymerase in genügender Menge anreichern zu können, wären etwa 4-5 kg Mikroplasmodien notwendig. Dies ist durch größere Ansätze mit Belüftung erreichbar.

Dazu werden 40 l Medium in drei 20 l Steilbrustflaschen zu 2 x 15 l und 1 x 10 l aufgeteilt und jede davon mit 1-2 Tropfen Niox Polyol LHT 67 als Antischaummittel versetzt. n-Octanol kann nicht verwendet werden, da bei dessen Zusatz die Mikroplasmodien schlecht wachsen. Die Flaschen werden mit einer Silikongummikappe mit zwei Öffnungen verschlossen. In einer davon steckt ein 10 cm langes Stahlrohr, auf dem ein Glastrichter ($\varnothing$ 5 cm) sitzt; durch die andere wird zur Belüftung ein Kohlendioxidschlauch geführt, der im Inneren mit einem Filterstein abgeschlossen und außen durch ein Stück Glasrohr verlängert ist. Zum Autoklavieren (40 min, 120°C, 9,81 Pa Überdruck) umwickelt man die Öffnung des Glasrohres sowie Stahlrohr und Trichter mit einer Aluminium-Folie. Gleichzeitig sterilisiert man drei Sartorius Filter ($\varnothing$ 5 cm) mit Nitrocellulosemembranen und drei Verschlußkappen aus Aluminium. Die Flaschen mit Medium müssen aus dem Autoklaven genommen werden, sobald die Temperatur auf 80-90°C gesunken ist, da bei längerer Abkühlungszeit die im Medium vorhandene Glukose zu stark karamelisiert.

Zur Vorbereitung des Inokulums transferiert man den Inhalt einer 500 ml Schüttelflasche in einen 1,8 l Fernbachkolben, in dem etwa 700 ml Medium sind. Diesen läßt man zwei Tage auf einer Schüttelmaschine leicht schwenken. Der Inhalt eines Fernbachkolbens dient als Inokulum für eine Zuchtflasche. Jede der Zuchtflaschen wird auf eine Schüttelmaschine gestellt, mit einem Luftfilter versehen und an die Preßluft angeschlossen, so daß der Inhalt gut, aber nicht zu heftig durchlüftet wird. Danach entfernt man die Hülle um den Glastrichter, hält eine Flamme fächernd über die Öffnung und fügt zunächst die Häminlösung zu. Bevor man aus einem Fernbachkolben die Mikroplasmodien zugibt, läßt man diese absitzen und gießt überschüssiges Medium ab. Die Mikroplasmodien eines Fernbachkolbens entsprechen etwa 50 g Frischgewicht. Nun wird der Glastrichter abgenommen und die Öffnung mit einer Metallkappe zugedeckt. Man läßt die Schüttelflaschen so stark schwenken, daß die Mikroplasmodien an keiner Stelle sedimentieren und die Bewegung der Flüssigkeit etwa in Resonanz mit der Bewegung der Schüttelmaschine ist. Nach drei bis vier Tagen sind die Mikroplasmodien gut gewachsen und können geerntet werden. Es lassen sich etwa 75-120 g Mikroplasmodien/l Medium erhalten.

2.15. DNA-Polymerasetest

Die Aktivität der DNA-Polymerase wurde als Einbau von (Methyl-³H)-2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat in säureunlösliches Material gemessen. Der Standard-Testansatz mit 100 µl Gesamtvolumen enthielt:

50 mM MOPS mit KOH auf pH 7.5 eingestellt
(K⁺ = 38 mM)
3 mM EGTA
3 mM β-Mercaptoäthanol
10 mM Mg-acetat • 4 H₂O

75 μM dATP, dCTP, dGTP
 15 μM [^3H]dTTP, spezifische Aktivität 2 Ci/mMol
 25 μg aktivierte DNA
 80 μg Rinderserumalbumin
 20 μl Enzympräparation

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 3 ml 4°C kalter 0,5 N PCA gestoppt. Das Ganze wird mindestens 30 min bei 4°C gehalten, dann in einer IEC/PR-6000 Zentrifuge 10 min bei 3400 Upm zentrifugiert. Den Überstand saugt man ab, zum Niederschlag gibt man 0,5 ml 0,5 N NaOH und läßt 10 min bei Raumtemperatur stehen. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 N PCA steht der Ansatz 30 min bei 4°C und wird dann durch Whatman GF/C Filter filtriert. Die Reagenzgläser werden einmal mit 3 ml kalter 0,5 N PCA, die Filter dreimal mit 3-5 ml kalter 0,5 N PCA und zweimal mit Äthanol gewaschen. Die getrockneten Filter steckt man in Szintillationsfläschchen, gibt 9 ml 0,6% PPO in Toluol zu und zählt während einer Minute die Impulse in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Intertechnique SL 30.

Abweichungen von diesem Standardtest sind bei den einzelnen Versuchen im Text angegeben.

Wenn für eine Probe mehrere Ansätze getestet wurden, sind Mittelwert und Standardabweichung nach folgenden Formeln berechnet worden:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Eine Aktivitätseinheit (Einheit) ist definiert als Einbau von 1 nMol dTMP in säureunlösliches Material pro 30 min im Standardtest. Die Angaben der Radioaktivität in den Diagrammen beziehen sich auf die Aktivität von 20 μl Enzympräparation.

2.16. Proteinbestimmung nach Neßler (63,64)

Die Substanz wird mit Selenoxychlorid-Schwefelsäure verascht, wobei Stickstoff in Ammoniumsulfat überführt wird. Neßler's Reagenz, die alkalische Lösung von Kalium [tetrajodomercurat(II)] ($K_2[HgJ_4]$), bildet mit Ammoniak eine orangebraune Verbindung $(Hg_2N)J$, ein Jodid der Millon'schen Base $(Hg_2N)OH$.

Neßler's Reagenz (64):

60 g Quecksilber(II)-chlorid löst man unter Erwärmen in 500 ml Wasser und fügt 74 g Kaliumjodid, gelöst in 500 ml Wasser, hinzu. Nach dem Absitzen des roten Quecksilber(II)-jodids wird dekantiert und dreimal mit Wasser ausgewaschen, um den Niederschlag möglichst chloridfrei zu machen. Man gibt 65-70 g Kaliumjodid hinzu bis der Niederschlag gerade gelöst ist. Die klare Lösung wird mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt und mit 500 ml 5 N Natronlauge ($\approx 20\%$) vermischt. Lichtgeschützt aufbewahren!

Veraschungsmixtur:

4 g wasserfreies Natriumsulfat in 25 ml Wasser lösen, 0,2 ml Selenoxychlorid (Vorsicht!) zufügen, mischen und vorsichtig 25 ml konzentrierte Schwefelsäure zugeben.

Ammoniumsulfat-Standardlösung:

47,2 mg getrocknetes Ammoniumsulfat und 10 ml konzentrierte Schwefelsäure mit bidestilliertem Wasser in 100 ml Meßkolben zur Marke auffüllen. 100 μ l Standardlösung enthalten 10 μ g Stickstoff und 10 μ l Schwefelsäure.

In Reagenzgläsern (160 x 18 mm) versetzt man Proben von etwa 500-1000 μ g Protein und maximalem Volumen von 1 ml mit 0,2 ml Veraschungsmixtur. Die Veraschung erfolgt bei etwa $310^\circ C$, wobei auf die Entfärbung aller Anteile zu achten ist. Nach dem Entfärben erhitzt man noch wei-

tere 10 min (Volumen pro Röhrchen 0,1 ml). Zur veraschten Lösung werden 5 ml Wasser gegeben; 500 μ l der Verdünnung enthalten 10 μ l Schwefelsäure und 7,5-15 μ g Stickstoff als Ammoniumsulfat. Proben mit 5-15 μ g Stickstoff und 5-15 μ l Schwefelsäure werden mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt, mit 1 ml Neßler's Reagenz versetzt und sofort gemischt. Die Extinktion wird nach 30 min gegen Wasser bei 440 nm abgelesen. Bei jeder Bestimmung läßt man Proben von 50, 100, 150 μ l der Ammoniumsulfat-Standardlösung mitlaufen.

Aus den Standardwerten wird der Faktor A errechnet:

$$A = \frac{\bar{E}_{440} \cdot 1000}{\mu\text{g N}}$$

Stickstoffgehalt im veraschten Volumen der Probenlösung:

$$\mu\text{g N/verashtes Volumen} = \frac{\bar{E}_{440} \cdot 1000}{A} \cdot \frac{\text{Totalvolumen der Verdünnung (ml)}}{\text{Volumen der nesslerisierten Probe (ml)}}$$

Proteingehalt/ml der veraschten Proteinlösung:

$$\frac{\text{mg Protein}}{\text{ml}} = 6,25 \cdot \frac{\mu\text{g N/verashtes Volumen}}{\text{Volumen der veraschten Probenlösung (ml)}}$$

2.17. Proteinbestimmung nach Lowry et al. (65)

Das Prinzip der Lowry-Bestimmung beruht darauf, daß zunächst Cu^{++} im Alkalischen mit Protein reagiert ähnlich wie bei der Biuret-Reaktion. Anschließend reduziert das kupferbehandelte Protein das Phosphomolybdän-Phosphowolfram Reagenz (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz) zu einem blauen Farbstoff.

Reagenzien:

- A: 2% Natriumcarbonat in Wasser
- B: 0,5% Kupfersulfat $\cdot$ 5 H₂O in 1% Natriumcitrat, bei 4°C aufbewahren
- C: 2 ml B + 100 ml A
- D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (2 Teile) + Wasser (3 Teile)

Als Standard dient eine Lösung von 50 mg Rinderserumalbumin (elektrophoretisch rein) in 50 ml 0,5 N Natronlauge, die bei 4°C aufbewahrt wird.

Zu 0,5 ml einer Probenlösung, die 10-250 µg Protein in 0,5 N Natronlauge enthält, werden 2,5 ml Lösung C gemischt, 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen, 0,2 ml Lösung D zugegeben und sofort geschüttelt. Nach 30-120 min wird die Extinktion bei 750 nm gegen den Blindwert gemessen. Die Extinktion der Blindwerte wird gegen Wasser gemessen und der niedrigste Wert für die Bestimmung benutzt.

Die Vorbereitung von Proben, die störende Substanzen wie β-Mercaptoäthanol, K⁺, Mg⁺⁺, Tris-maleat enthalten, geschieht durch Fällung des Proteins mit 10% TCA (bei Anwesenheit von K⁺) oder 0,5 N PCA. Nach 20 min Stehenlassen, Zentrifugation bei 3000 Upm, 10 min (IEC-Zentrifuge) und Absaugen des Überstandes wird der Niederschlag in 0,5 N Natronlauge gelöst. Bei gefärbtem Probenmaterial aus Physarum wird zuvor einmal mit 5% TCA in Aceton/Wasser (3:1) gefällt, um die Pigmente auszuwaschen. Ist wenig Protein im Probenmaterial enthalten (<50 µg), gibt man vor der Fällung etwa 100 µg DNA zu.

2.18. Auswertung der Proteinbestimmung nach Lowry

Die Beziehung zwischen Extinktion und Proteinmenge ist bei der Lowry-Methode nicht linear (65). Aus diesem Grund muß von den Eichwerten zuerst ein Diagramm ge-

zeichnet werden. Wegen des zeitlichen Rechenaufwandes (Mittelwert, grafische Ermittlung der Proteinkonzentration, Umrechnung auf mg/ml) sollte daher ein Rechenprogramm zur numerischen Ausrechnung entwickelt werden. Dazu stand ein Multi 8 Computer (Intertechnique) zur Verfügung mit LEM als Computersprache (Interpretations- und Rechenprogramm) (66).

Da der Computer die Eichkurve in Form einer Funktion kennen muß, war es notwendig, ein geeignetes mathematisches Verfahren zu finden, das es dem Rechner erlaubt, zu den Wertepaaren der Eichung eine passende Funktion ϕ zu berechnen (67). Dazu gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, die Approximations- und die Interpolationsverfahren. Interpolierende Funktionen besitzen die Eigenschaft, daß sie genau durch die Stützstellen (Eichwerte) gehen, aber zwischen den Stützstellen durchaus einen anderen Verlauf als den erwarteten haben können. Geeigneter erscheint deshalb ein Approximationsverfahren, bei dem eine Funktion ϕ gesucht ist, deren Summe der Abstandskquadrate von den Funktionswerten an den Stützstellen minimal ist (Regressionskurve). Die diskrete Gauß'sche Fehlerquadratmethode erschien für dieses Problem geeignet zu sein.

Von einer Funktion f sind an $N + 1$ diskreten Stellen x_i , $i = 0 \dots N$ die Werte $f(x_i)$ in Form einer Wertetabelle (Eichwerte) gegeben. Gesucht ist für $f(x)$ die beste Approximation $\phi^{(0)}(x)$.

Als Approximationsfunktionen ϕ dienen Linearkombinationen von $n+1$ linear unabhängigen Funktionen ψ_k mit den reellen Konstanten C_k .

$$\phi(x) = \sum_{k=0}^n C_k \psi_k(x)$$

n darf höchstens so groß sein wie die um 1 verminderte Zahl der Stützstellen

Unter Verwendung einer Abstandsnorm lautet die Bedingung für eine beste Approximation:

$$\min_{\phi} \|f - \phi^{(0)}\|^2 = \min_{\phi} \|f - \phi\|^2 = \min_{\phi} \sum_{i=0}^N w_i \{f(x_i) - \phi(x_i)\}^2 = \min_{\phi} D^2(c_0, c_1, \dots, c_n)$$

Die Gewichte w_i sind ein Maß für die Genauigkeit der Meßwerte. Sie wurden gleich 1 gesetzt.

Unter Verwendung der Minimumsbedingung (erste Ableitung = 0)

$$\frac{\partial D^2}{\partial c_j} = -2 \sum_{i=0}^N \{f(x_i) - \phi(x_i)\} \frac{\partial \phi(x_i)}{\partial c_j} = 0 \quad j = 0(1)n$$

erhält man mit

$$\frac{\partial \phi(x_i)}{\partial c_j} = \psi_j(x_i) \quad ; \quad \phi(x_i) = \sum_{k=0}^n c_k \psi_k(x_i)$$

das lineare Gleichungssystem

$$\sum_{k=0}^n c_k^{(0)} \sum_{i=0}^N \psi_k(x_i) \psi_j(x_i) = \sum_{i=0}^N f(x_i) \psi_j(x_i)$$

$$j = 0(1)n; N \geq n$$

Bei der diskreten Gauß'schen Fehlerquadratmethode werden als Approximationsfunktion ϕ algebraische Polynome verwendet.

Für $n = 3$ erhält man:

$$\phi(x) = c_0 + c_1 x + c_2 x^2 + c_3 x^3$$

In das lineare Gleichungssystem ist dann für $\psi_k(x_i) = x_i^k$ und für $\psi_j(x_i) = x_i^j$ zu setzen.

$$\sum_{k=0}^n c_k^{(0)} \sum_{i=0}^N x_i^{k+j} = \sum_{i=0}^N f(x_i) x_i^j$$

$$j = 0(1)n; N > n$$

Für $n = 3$ (algebraisches Polynom 3. Grades) ergibt diese Formel ein lineares Gleichungssystem von vier Gleichungen mit vier Unbekannten $c_k^{(0)}$.

$$\begin{pmatrix} \Sigma 1 & \Sigma x_1 & \Sigma x_1^2 & \Sigma x_1^3 \\ \Sigma x_1 & \Sigma x_1^2 & \Sigma x_1^3 & \Sigma x_1^4 \\ \Sigma x_1^2 & \Sigma x_1^3 & \Sigma x_1^4 & \Sigma x_1^5 \\ \Sigma x_1^3 & \Sigma x_1^4 & \Sigma x_1^5 & \Sigma x_1^6 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} c_0^{(0)} \\ c_1^{(0)} \\ c_2^{(0)} \\ c_3^{(0)} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Sigma f(x_1) \\ \Sigma f(x_1) x_1 \\ \Sigma f(x_1) x_1^2 \\ \Sigma f(x_1) x_1^3 \end{pmatrix}$$

$$A \cdot r = b$$

Einen allgemeinen Lösungsweg für lineare Gleichungssysteme bietet der Gauß-Algorithmus. Da A jedoch in diesem Fall eine symmetrische 4×4 Matrix ist, stellt das Gauß-Doolittle-Schema ein praktisches Lösungsverfahren dar. Es soll nur das allgemeine Schema skizziert werden (68).

2.18.1. Gauß-Doolittle-Schema zur Lösung eines linearen Systems von vier Gleichungen mit den vier Unbekannten a, b, c und d des Polynoms $y = a + bx + cx^2 + dx^3$

	a	b	c	d	rechte Seite
1.	a_{11}	a_{21}	a_{31}	a_{41}	a_{y1}
2.		a_{22}	a_{32}	a_{42}	a_{y2}
3.			a_{33}	a_{43}	a_{y3}
4.				a_{44}	a_{y4}
5.	a_{11}	a_{21}	a_{31}	a_{41}	a_{y1}
6.	1	b_{21}	b_{31}	b_{41}	b_{y1}
7.		$a_{22.1}$	$a_{32.1}$	$a_{42.1}$	$a_{y2.1}$
8.		1	$b_{32.1}$	$b_{42.1}$	$b_{y2.1}$
9.			$a_{33.12}$	$a_{43.12}$	$a_{y3.12}$
10.			1	$b_{43.12}$	$b_{y3.12}$
11.				$a_{44.123}$	$a_{y4.123}$
12.				1	$b_{y4.123}$
13.	$d = b_{y4.123}$ $c = b_{y3.12} - b_{43.12} d$ $b = b_{y2.1} - b_{42.1} d - b_{32.1} c$ $a = b_{y1} - b_{41} d - b_{31} c - b_{21} b$				

In Zeile 1-4 werden die Koeffizienten des Gleichungssystems eingesetzt. Zeile 5 ist die Abschrift von Zeile 1.

Zeile 6: $b_{i1} = \frac{a_{i1}}{a_{11}}$ Jedes Glied von Zeile 5 wird durch a_{11} dividiert.

Zeile 7: $a_{22.1} = a_{22} - a_{21} b_{21}$ $a_{32.1} = a_{32} - a_{31} b_{21}$
 $a_{42.1} = a_{42} - a_{41} b_{21}$ $a_{y2.1} = a_{y2} - a_{y1} b_{21}$

Zeile 8: $b_{i2.1} = \frac{a_{i2.1}}{a_{22.1}}$ Jedes Glied von Zeile 7 wird durch $a_{22.1}$ dividiert.

Zeile 9: $a_{33.12} = a_{33} - a_{31} b_{31} - a_{32.1} b_{32.1}$
 $a_{43.12} = a_{43} - a_{41} b_{31} - a_{42.1} b_{32.1}$
 $a_{y3.12} = a_{y3} - a_{y1} b_{31} - a_{y2.1} b_{32.1}$

Zeile 10: $b_{i3.12} = \frac{a_{i3.12}}{a_{33.12}}$ Jedes Glied der Zeile 9 wird durch $a_{33.12}$ dividiert.

Zeile 11: $a_{44.123} = a_{44} - a_{41} b_{41} - a_{42.1} b_{42.1} - a_{43.12} b_{43.12}$
 $a_{y4.123} = a_{y4} - a_{y1} b_{41} - a_{y2.1} b_{42.1} - a_{y3.12} b_{43.12}$

Zeile 12: $b_{y4.123} = \frac{a_{y4.123}}{a_{44.123}}$

Aus Zeile 13 geht die Berechnung der gesuchten Koeffizienten a , b , c , d bzw. c_0 , c_1 , c_2 , c_3 hervor. Dieser Algorithmus ist zur Programmierung eines Computers gut geeignet. Aus den eingegebenen Eichwerten (eingesetzte Menge Protein, Extinktion bei 750 nm) berechnet der Computer zuerst eine Approximationsfunktion der Art $\phi = c_0 + c_1 x + c_2 x^2 + c_3 x^3$. Danach gibt man die Meßwerte x ein, und der Rechner ermittelt den dazugehörigen Funktionswert ϕ (Proteinmenge), der in $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet wird (s. Abb. 4 und Abschnitt 2.18.3.).

2.18.2. Programm zur Approximation eines Polynoms dritten Grades und zur Berechnung der Proteinmenge aus den eingegebenen Extinktionswerten.

```

ONITOR LEM,LP?2
PROGRAM

G33
.LIS1
.OOORED'PROBENANZAHL'KZ
.OOON=200
.OOON=N+1
.OO(1020
.OOI=N
.OOMI=C
.OOPN15MI,2@'MI-WERT'2'
.OO<Z,10
.OOPNI'APPROXIMATION EINES POLYNOMS 3. GRADES'2'
.O.OPNT'M201'@@'M202'@@'M203'@@'M204'@@'M205'@@'M206'@@'M207'@@
.O1.OPNT'M208'@@'M209'@@'M210'2'
.O5.OPNT5M201@5M202@5M203@5M204@5M205@5M206@5M207@5M208@5M209@5M210
.O6.OPNI3'
.O.OPNI'M301'@@'M302'@@'M303'@@'M304'@@'M305'@@'M306'@@'M307'
.O1.OPNT@@'M308'@@'M309'@@'M310'2'
.O5.ORED KM301,K@,KM302,K@,KM303,K@,KM304,K@,KM305,K@,KM306,K@,KM307,
.O6.ORED K@,KM308,K@,KM309,K@,KM310,K3'
.O.O M1=M201*M201
.O1.O M2=M202*M202
.O2.O M3=M203*M203
.O3.O M4=M204*M204
.O4.O M5=M205*M205
.O5.O M6=M206*M206
.O6.O M7=M207*M207
.O7.O M8=M208*M208
.O8.O M9=M209*M209
.O9.O M10=M210*M210
.O10.O M11=M1*M201
.O11.O M12=M2*M202
.O12.O M13=M3*M203
.O13.O M14=M4*M204
.O14.O M15=M5*M205
.O15.O M16=M6*M206
.O16.O M17=M7*M207
.O17.O M18=M8*M208
.O18.O M19=M9*M209
.O19.O M20=M10*M210
.O20.O M21=M1*M1
.O21.O M22=M2*M2
.O22.O M23=M3*M3
.O23.O M24=M4*M4
.O24.O M25=M5*M5
.O25.O M26=M6*M6
.O26.O M27=M7*M7
.O27.O M28=M8*M8
.O28.O M29=M9*M9
.O29.O M30=M10*M10
.O30.O M31=M201*M301

```

181.0M32=M202*M302
182.0M33=M203*M303
183.0M34=M204*M304
184.0M35=M205*M305
185.0M36=M206*M306
186.0M37=M207*M307
187.0M38=M208*M308
188.0M39=M209*M309
189.0M40=M210*M310
200.0M41=M1*M301
201.0M42=M2*M302
202.0M43=M3*M303
203.0M44=M4*M304
204.0M45=M5*M305
205.0M46=M6*M306
206.0M47=M7*M307
207.0M48=M8*M308
208.0M49=M9*M309
209.0M50=M10*M310
210.0M51=M11*M301
211.0M52=M12*M302
212.0M53=M13*M303
214.0M54=M14*M304
215.0M55=M15*M305
216.0M56=M16*M306
217.0M57=M17*M307
218.0M58=M18*M308
219.0M59=M19*M309
220.0M60=M20*M310
221.0M61=M21*M201
222.0M62=M22*M202
223.0M63=M23*M203
224.0M64=M24*M204
225.0M65=M25*M205
226.0M66=M26*M206
227.0M67=M27*M207
228.0M68=M28*M208
229.0M69=M29*M209
230.0M70=M30*M210
231.0M71=M11*M11
232.0M72=M12*M12
233.0M73=M13*M13
234.0M74=M14*M14
235.0M75=M15*M15
236.0M76=M16*M16
237.0M77=M17*M17
238.0M78=M18*M18
239.0M79=M19*M19
240.0M80=M20*M20
245.0M81=M201+M202+M203+M204+M205+M206+M207+M208+M209+M210
250.0M82=M1+M2+M3+M4+M5+M6+M7+M8+M9+M10
255.0M83=M11+M12+M13+M14+M15+M16+M17+M18+M19+M20
260.0M84=M21+M22+M23+M24+M25+M26+M27+M28+M29+M30
265.0M85=M61+M62+M63+M64+M65+M66+M67+M68+M69+M70
270.0M86=M71+M72+M73+M74+M75+M76+M77+M78+M79+M80
275.0M87=M301+M302+M303+M304+M305+M306+M307+M308+M309+M310
280.0M88=M31+M32+M33+M34+M35+M36+M37+M38+M39+M40
285.0M89=M41+M42+M43+M44+M45+M46+M47+M48+M49+M50
290.0M90=M51+M52+M53+M54+M55+M56+M57+M58+M59+M60
295.0M91=M81*M81

300.0M92=M82*M81
305.0M93=M83*M81
310.0M94=M87*M81
315.0M95=M82-M91
320.0M96=M83-M92
325.0M97=M84-M93
330.0M98=M88-M94
335.0M99=M96/M95
340.0M100=M97/M95
345.0M101=M98/M95
350.0M102=M82*M82
355.0M103=M83*M82
360.0M104=M87*M82
365.0M105=M96*M99
370.0M106=M97*M99
375.0M107=M98*M99
380.0M108=M84-M102-M105
385.0M109=M85-M103-M106
390.0M110=M89-M104-M107
395.0M111=M109/M108
400.0M112=M110/M108
405.0M113=M83*M83
410.0M114=M87*M83
415.0M115=M97*M100
420.0M116=M98*M100
425.0M117=M109*M111
430.0M118=M110*M111
435.0M119=M86-M113-M115-M117
440.0M120=M90-M114-M116-M118
445.0M121=M120/M119
450.0M122=M111*M121
455.0M123=M112-M122
460.0M124=M100*M121
465.0M125=M99*M123
470.0M126=M101-M124-M125
475.0M127=M83*M121
480.0M128=M82*M123
485.0M129=M81*M126
490.0M130=M87-M127-M128-M129
495.OPNT2@'C0'6@'C1'6@'C2'6@'C3'
496.OPNT'
500.OPNT6M130,2@6M126,2@6M123,2@6M121
501.OPNT3'
505.OPNT@'VCL'3@'MLNACH'3@'E'29@'MI-E'@'UG/PR'@'UG/VCL'@'UG/ML'2'
510.ORED KX,K2@
515.OX?625,625,520
520.ORED KY,K2@
525.OB=0
530.OI=0
535.OI=I+1
540.ORED KA,K@
545.OA?560,560,550
550.OB=B+A
555.OJMP535
560.OI=I-1
565.OC=B/I
570.OM135=M126*C
575.OM136=M123*C*C
580.OM137=M121*C*C*C

```
585.0M138=M130+M135+M136+M137
590.0W=Y/O.5
595.0N=1/X
600.0I=M138*W
605.0M140=N*T
606.0I=4-I
610.0I=I*6
611.0I?612,612,615
612.0PNT@5C,@5M138,@5T,2@5M140,2†
613.0JMP620
615.0PNTI@,@5C,@5M138,@5T,2@5M140,2†
620.0JMP510
625.0HLT
1020.B=0
1025.I=0
1030.I=I+1
1035.REDK'A',KA
1040.A? 1055,1055,1045
1045.B=B+A
1050.JMP1030
1055.I=I-1
1056.C=B/I
1060.)
```

In Abb. 4 ist der Graf einer approximierten Funktion im Vergleich zur dazugehörigen empirischen Eichkurve dargestellt. Wie die errechneten Werte zeigen, ist ihre Abweichung von den Sollwerten nicht größer als 2%, wobei die Sollwerte ebenfalls einer Streuung durch Meßfehler unterliegen.

Dieses Programm ist ohne Änderung auch zur Auswertung der Proteinbestimmung nach Neßler geeignet. Man erhält als Ergebnis μg Stickstoff/ml. Dieses muß noch durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 in μg Protein/ml umgerechnet werden.

2.18.3. Beispiel zur Berechnung einer Approximationsfunktion
und von Proteingehalten nach dem in 2.18.2 darge-
stellten Programm.

ONITOR LEM,LP72
ROGRAM

G03
EX
686
ROBENANZAHL76
7065 A7067 A7062 A70 64.66 MI-WERT
7119 A7128 A7120 A70 122.3 MI-WERT
7271 A7276 A7275 A70 274.0 MI-WERT
7462 A7474 A7463 A70 466.3 MI-WERT
7645 A7632 A7629 A70 635.3 MI-WERT
7751 A7771 A7789 A70 770.3 MI-WERT

PROXIMATION EINES POLYNOMS 3. GRADES

201 M202 M203 M204 M205 M206 M207 M208 M209 M210
4.66 122.3 274.0 466.3 635.3 770.3 0.000 0.000 0.000 0.000

301 M302 M303 M304 M305 M306 M307 M308 M309 M310
010 7020 7050 7100 7150 7200 7000 7000 7000 7000

C0 C1 C2 C3
.0304 0.1473 0.0001 0.0000

VOL	MLNAJH	E	MI-E	UG/PR	UG/VOL	UG/ML
.01	70.5	7065	7000	65.00	10.15	10.15
.02	70.5	7122	7000	122.0	19.95	19.95
.05	70.5	7274	7000	274.0	50.48	50.48
0.1	70.5	7466	7000	466.0	98.77	98.77
.15	70.5	7635	7000	635.0	150.9	150.9
0.2	70.5	7770	7000	770.0	199.5	199.5
0.5	70.5	70001	700	1.000	0.177	0.177
0.5	70.5	7050	7000	50.00	7.720	7.720

70.5	70.5	7065	7000	65.00	10.15	10.15	20.31
70.5	70.5	7100	7000	100.0	16.06	16.06	32.13
70.5	70.5	7122	7000	122.0	19.95	19.95	39.91
70.5	70.5	7200	7000	200.0	34.80	34.80	69.61
70.5	70.5	7274	7000	274.0	50.48	50.48	100.9
70.5	70.5	7300	7000	300.0	56.37	56.37	112.7
70.5	70.5	7400	7000	400.0	80.89	80.89	161.7
70.5	70.5	7466	7000	466.0	98.77	98.77	197.5
70.5	70.5	7500	7000	500.0	108.5	108.5	217.0
70.5	70.5	7600	7000	600.0	139.3	139.3	278.6
70.5	70.5	7635	7000	635.0	150.9	150.9	301.8
70.5	70.5	7700	7000	700.0	173.5	173.5	347.0
70.5	70.5	7770	7000	770.0	199.5	199.5	399.0
70.5	70.5	7800	7000	800.0	211.1	211.1	422.3
70.5	70.5	7900	7000	900.0	252.4	252.4	504.9

70

625.OLP 2

Zuerst wird die Zahl der Eichwerte (Probenanzahl = Zahl der Stützstellen) eingegeben. Danach folgt die Eingabe der Extinktionswerte jeder einzelnen Stützstelle. Die Angabe der Extinktion 0 bewirkt die Berechnung des Mittelwertes der zuvor eingegebenen Werte. M201-M210 sind die Mittelwerte der Extinktion der einzelnen Stützstellen, M301-M310 die zur Eichung eingesetzten Proteinmengen in $\mu\text{g/ml}$. Die Koeffizienten c_0 , c_1 , c_2 , c_3 des Approximationspolynoms sind 5-stellig ausgedruckt, der Computer rechnet jedoch mit acht Stellen. VOL bedeutet das eingesetzte Probenvolumen, MLNAOH die Menge 0,5 N Natronlauge, die zur Lösung des Proteins insgesamt erforderlich war; E ist die Extink-

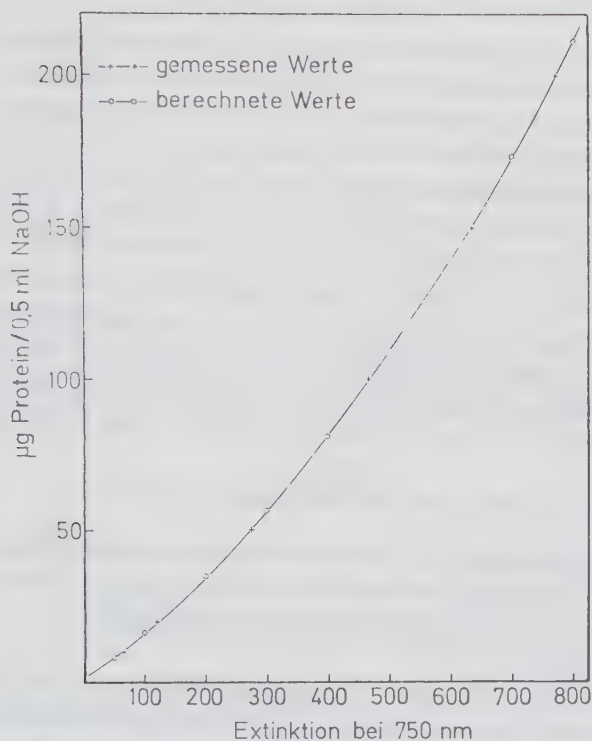


Abb. 4: Graf einer approximierten Funktion. Vergleich gemessener und berechneter Funktionswerte.

tion von 0,5 ml Natronlauge mit gelöstem Protein, $MI-E$ der Mittelwert der Extinktion, UG/PR die darin enthaltene Proteinmenge; UG/VOL ist die Proteinmenge im Gesamtvolumen der zur Lösung des Proteins eingesetzten Natronlauge, UG/ML die Proteinmenge/ml der ursprünglich eingesetzten Fraktion.

2.19. Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Der Proteingehalt von Säuleneeluaten wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm mit einer ISCO Optical Unit Typ 6 gemessen und mit einem ISCO UA5 Absorbance Monitor aufgeschrieben.

Rinderserumalbumin wurde als Standard verwendet. Bei einem Absorptionsbereich von 0,1 bedeutet 1 cm Schreiberanschlag eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml.

In manchen Fraktionen wurde das Protein durch Messung von OD_{280} und OD_{260} nach Kalckar bestimmt. Das Kalckar-Protein in mg/ml ergibt sich aus folgender Formel:
 $1,45 OD_{280} - 0,75 OD_{260}$. Der Quotient OD_{280}/OD_{260} ist ein Maß für den Nukleinsäureanteil einer Fraktion (69).

2.20. DNA-Bestimmung mit Diphenylamin nach Burton

Puringebundene Desoxyribose gibt mit Diphenylamin in einer Mischung von Essigsäure und Schwefelsäure eine blaue Verbindung unbekannter Natur (70).

Reagenzien:

Diphenylaminlösung: 1,5 g Diphenylamin werden in 100 ml Eisessig gelöst und 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt. Das Reagenz kann in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Acetaldehydlösung: 2,0 ml Acetaldehyd mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen und die Lösung bei 4°C aufbewahren. Kurz vor Gebrauch gibt man 100 µl kalte Acetaldehydlösung zu 20 ml Diphenylaminlösung.

Die bei 0°C zweimal mit 4 ml eiskalter 0,25 M PCA extrahierte Probe wird mit 0,5 M PCA 20 min bei 70°C im Wasserbad hydrolysiert, zentrifugiert (10 min, 4000 Upm, Christ-Minifuge) und der Überstand sorgfältig abgehoben. Der Niederschlag wird nochmals mit 0,5 M PCA hydrolysiert, zentrifugiert und der Überstand mit dem vorhergehenden vereinigt. Das Volumen an PCA wählt man so, daß eine Konzentration von 4-100 µg DNA/ml erhalten wird.

Das Gesamtvolumen wird notiert. Der Niederschlag kann zur Proteinbestimmung verwendet werden.

In Reagenzgläsern (100 x 16 mm) werden 0,5 ml 0,5 M perchlorsaure Probenlösung ($\approx$ 2-50 μ g DNA) mit 1,0 ml Diphenylamin-Acetaldehydlösung gemischt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 20-24 Stunden inkubiert.

0,5 M PCA und Diphenylamin-Acetaldehydlösung im Verhältnis 1 + 2 gemischt ergeben den Blindwert.

Proben und Blindwert werden bei 590 nm gegen Wasser gemessen.

Nach dem Abziehen des Blindwertes wird der Extinktionsmittelwert $\bar{E}$ der Proben bestimmt. Ein Faktor A wird aus den Standardwerten nach folgender Formel berechnet:

$$A = \frac{\bar{E} \times 1000}{\mu\text{g DNA}}$$

Als DNA-Konzentration im PCA-Hydrolysat ergibt sich:

$$\frac{\mu\text{g DNA}}{\text{ml Hydrolysat}} = \frac{\bar{E} \times 10^6}{A \times \text{Probenvolumen Hydrolysat in } \mu\text{l}}$$

2.21. Bestimmung der β -Galaktosidase (EC 3.2.1.23)

β -Galaktosidase spaltet o-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid in o-Nitrophenol und Galaktose. Mit Natriumcarbonat wird das o-Nitrophenol in das gelb gefärbte Anion überführt.

Substratlösung:

o-Nitrophenyl- β -galaktopyranosid wird in 2 mM Konzentration in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2 gelöst. Diese Lösung ist frisch herzustellen.

Zu 500 μ l Substratlösung gibt man 20 μ l Enzymlösung aus einer Fraktion eines Dichtegradienten und inkubiert 10 min lang bei 30°C im Wasserbad. Durch Zugabe von 2 ml 0,2 M Natriumcarbonat-Lösung wird die Reaktion gestoppt und danach die Extinktion bei 405 nm gegen den Blindwert abgelesen.

2.22. Bestimmung der Katalase (EC 1.11.1.6)

Katalase spaltet Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.

Substratlösung:

Etwa 20 mM Wasserstoffperoxid werden mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gemischt. Dazu gibt man 29,4 ml 50 mM Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung und 20,6 ml 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung zusammen, stellt auf pH 7,0 ein, fügt 400 µl 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung hinzu und füllt auf 250 ml mit Wasser auf. Die Extinktion dieser Lösung bei 240 nm soll etwa 0,6 betragen. Die Lösung ist frisch herzustellen.

Zu 2,5 ml Substratlösung in einer Quarzküvette gibt man 5-20 µl Enzymlösung (aus dem Dichtegradienten), mischt schnell durch und verfolgt am Schreiber (Papiervorschub 30 mm/min) für 20-60 s den Abfall der Extinktion bei 240 nm/Zeiteinheit.

2.23. Bestimmung der Alkohol-Dehydrogenase (EC 1.1.1.1)

Alkohol-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Alkohol in Acetaldehyd unter Bildung von NADH gemäß der Formel:



Reagenzien:

Natriumpyrophosphat-Glycin-Puffer: 4,46 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 0,17 g Glycin werden mit Wasser zu 100 ml gelöst.

Substratlösung:

Natriumpyrophosphat-Glycin-Puffer	20,9 ml
Semicarbazid-Lösung (250 mg/ml)	1,0 ml
Äthanol absolut	1,0 ml
NAD^+ -Lösung (20 mg/ml)	2,0 ml
Glutathion-Lösung (90 mg/ml)	0,1 ml

Dieses Gemisch wird mit wenigen Tropfen 1 N Natronlauge auf pH 8,6-8,7 gebracht.

In einer Quarzküvette gibt man zu 1,0 ml der Substratlösung 10 μ l Enzymlösung (aus dem Dichtegradienten), mischt schnell durch und verfolgt auf einem Schreiber den Anstieg der Extinktion bei 340 nm/Zeiteinheit.

2.24. Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)

Lactat-Dehydrogenase katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat unter Verbrauch von NADH nach folgender Gleichung:



Die Messungen wurden mit Reagenzien der Fa. Merck, Darmstadt, für den optimierten UV-Test von LDH ausgeführt. In der Puffer-Substrat-Lösung waren enthalten:

Phosphatpuffer pH 7,5	50 mM
Natriumpyruvat	0,6 mM
NADH ₂	0,11 mM

In einer Küvette werden zu 1,0 ml der Puffer-Substratlösung 10 μ l Enzymlösung (aus dem Dichtegradienten) hinzupipettiert, rasch durchgemischt und mit einem Schreiber der Abfall der Extinktion bei 340 nm/Zeiteinheit gemessen.

2.25. Herstellung von aktivierter DNA (71)

Unter aktivierter DNA versteht man doppelsträngige DNA mit Einzelstrangbrüchen und kleinen Lücken (23). Sie wird hergestellt durch kurzzeitige Einwirkung von Desoxyribonuklease I auf native DNA.

Lösungen:

Magnesium-Tris-Puffer:

Magnesiumacetat $\cdot$ 4H ₂ O	10 mM
Tris (Base)	50 mM
mit 1 N Essigsäure auf pH 7,8 einstellen.	

DNase-Lösung

Desoxyribonuklease I, Reinheitsgrad II, Boehringer
20 µg/ml Magnesium-Tris-Puffer

Die DNase wird bei 0°C in einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst, danach mit eiskaltem Magnesium-Tris-Puffer 1 + 4 verdünnt ($\hat{=}$ 20 µg/ml) und in 1 ml Portionen bei -25°C aufbewahrt.

Nach 5 min langer Präinkubation der DNA-Lösung bei 37°C gibt man zur enzymatischen Hydrolyse pro 1 ml DNA-Lösung 0,2 µg DNase ($\hat{=}$ 10 µl DNase-Lösung) zu und inkubiert weitere 15 min bei 37°C. Die Reaktion wird gestoppt, indem man den Ansatz auf 0°C abkühlt, pro 1 ml 58 mg Natriumchlorid ($\hat{=}$ 1 M) zugibt und dann 30 min auf 60°C erhitzt. Anschließend wird der Ansatz erst gegen das 100-200-fache Volumen 0,2 M Kaliumchlorid 6-15 Stunden dialysiert und danach gegen 10 mM Kaliumchlorid.

Zu verschiedenen Zeiten der Präparation werden Proben für die DNA-Bestimmung nach Burton entnommen.

- (1) Gesamt-DNA: Nach der enzymatischen Hydrolyse werden 2 x 10 µl abgenommen und mit 500 µl 0,5 M PCA bei 70°C 20 min säurehydrolysiert.
- (2) Säurelösliche DNA: Nach der enzymatischen Hydrolyse fällt man in konischen Zentrifugengläsern aus 1 ml Probe mit 1 M PCA die säureunlöslichen Anteile aus. Nach 30 min Stehenlassen bei 0°C wird zentrifugiert (10 min, 3000 Upm, Christ-Zentrifuge). Vom Überstand werden 2 x 500 µl und 2 x 200 µl, die mit 0,5 M PCA auf 500 µl gebracht werden, bei 70°C 20 min säurehydrolysiert.
- (3) Säureunlöslich gebliebene DNA: Der Niederschlag von (2) wird mit 5,0 ml 0,5 M PCA säurehydrolysiert (70°C, 20 min). Je 2 x 50 µl

entnimmt man für die Bestimmung.

- (4) Nicht-dialysable DNA: Nach der Dialyse hydrolysiert man $2 \times 10 \mu\text{l}$ mit je $500 \mu\text{l}$ $0,5 \text{ M PCA}$ bei 70°C 20 min lang.

3,0-3,6% der säureunlöslichen bzw. nicht-dialysablen DNA wurden durch die DNase-Behandlung säurelöslich. Es fiel auf, daß der Wert der nicht-dialysablen DNA immer etwas niedriger als der Wert der säureunlöslichen DNA war. Offenbar entstanden bei der Hydrolyse Bruchstücke, die kleiner als die Ausschlußgrenze des Dialyseschlauches (10 000 Daltons), aber immer noch säurefällbar waren (etwa 2-3% der säureunlöslichen DNA).

Aktivierter DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.26. Präparation von denaturierter DNA, von $p(A) \cdot (dT)_{10}$ (A:T=20:1) und $p(dA) \cdot (rU)_{12-18}$

Denaturierte DNA wurde hergestellt, indem eine Lösung von 2,5 mg nativer DNA (Lachssperma)/ml 10 mM Kaliumchlorid-Lösung 10 min auf 80°C erhitzt und schnell abgekühlt wurde.

Zu 5 OD_{260} -Einheiten $p(A) \cdot (dT)_{10}$, A:T = 1:1 (1 OD_{260} -Einheit $\hat{=}$ $40 \mu\text{g}$ Substanz), gelöst in 0,5 ml 0,1 M Natriumchlorid wurden 1,9 mg Polyadenylsäure gegeben, um ein Basenverhältnis A:T = 20:1 zu erhalten. Diese Lösung wurde 10 min lang auf 80°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zu 5 OD_{260} -Einheiten $p(dA) \cdot (rU)_{12-18}$ wurden $160 \mu\text{l}$ Wasser gegeben. Nach 5 min langem Erwärmen auf 40°C wurde die Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (72).

Alle Lösungen von Starter-Matrizen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.27.1. Nicht-denaturierende Elektrophorese

Nicht-denaturierende Elektrophorese wurde modifiziert nach Holmes, Hesslewood und Johnston (73) ausgeführt.

Lösungen:

A: Ammediol • HCl pH 9,0	0,8 M
B: Acrylamid	22,2 % (G/V)
N,N'-Methylen-bisacrylamid	0,6 % (G/V)

Probenpuffer:

Ammediol • HCl pH 9,0	20 mM
Dithiothreitol	2 mM
Glycerin	25 % (V/V)

Kathodenpuffer für Vorelektrophorese:

Ammediol • HCl pH 9,0	0,4 M
-----------------------	-------

Elektrodenpuffer pH 9,0

Ammediol	0,04 M
Glycin	0,15 M
Thioglycolsäure Na-salz	5 mM

Alle Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

Färbelösung nach Weber und Osborn (74):

Coomassie brilliant blue R250

	1,25 g
Methanol	227 ml
Eisessig	46 ml
Wasser ad	500 ml

Entfärbelösung:

Methanol	50 ml
Eisessig	75 ml
Wasser ad	1000 ml

Zur Herstellung eines 7%igen Gels wurden verwendet:

Lösung A	16 ml
Lösung B	10,1 ml
Glycerin	4 g ($\approx$ 3,2 ml)
Wasser	2,7 ml

Diese Mischung wird entgast und mit 80 μ l 10%iger Ammonimpersulfat-Lösung und 10 μ l TMED versetzt. Zur Polymerisation füllt man die Röhrchen ($\varnothing$ 6 mm, Länge 100 mm) 8 cm hoch und überschichtet die Gellösung mit 200 μ l Isobutanol, um einen ebenen Meniskus zu erhalten. Die Gele können bis zum Gebrauch eingeschweißt in Plastikbeutel bei 4°C etwa einen Monat lang aufbewahrt werden, wenn man zuvor das Isobutanol abgießt und durch ein 10%iges Glycerin-Wasser-Gemisch ersetzt.

Ausführung:

Alle nicht-denaturierenden Elektrophoresen und darauffolgenden Elutionsverfahren wurden im Kältelabor bei 4°C ausgeführt.

Störende Reste von Ammoniumpersulfat im Gel werden durch eine Vorelektrophorese entfernt. In die Anodenkammer wird Elektrodenpuffer eingefüllt, in die Kathodenkammer Puffer für Vorelektrophorese, der die gleiche ionische Zusammensetzung wie das Gel hat. Das soll verhindern, daß bereits vor dem Auftragen Glycinationen in das Gel einwandern. Die Vorelektrophorese wird 30 min bei 4 mA/Gel ausgeführt. Danach gießt man den Vorelektrophoresepuffer ab und füllt Elektrodenpuffer ein.

Von den 2-3 Stunden gegen Probenpuffer dialysierten Proben mit 50-300 μ g Protein/ml gibt man 300-400 μ l auf ein Gel und läßt 4-5 Stunden mit 4 mA/Gel entwickeln. Zu einer Probe mischt man vor dem Lauf einen Tropfen 0,1%ige Bromphenolblau-Lösung, um die Lauf-

front besser erkennen zu können. Nach dem Entwickeln gießt man den Elektrodenpuffer ab und legt die Gelröhrchen sofort auf Eis. Die Gele werden mit Wasser vom Glas abgelöst, aus den Röhrchen entnommen und auf einer Glasplatte über Trockeneis eingefroren und aufbewahrt. Eines der Gele färbt man nach Weber und Osborn (74) mit Coomassie Blau eine Stunde lang und läßt bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 45-50°C entfärben.

Wenn die Gele hart gefroren sind, wird eines davon mit einem Satz von 25 Rasierklingen, die alle im Abstand von 2,1 mm angeordnet sind, geschnitten. Jedes Scheibchen bringt man mit einer Pinzette in ein Reagenzglas mit 0,5 ml 0,2 M Kaliumchlorid in Puffer 2 und 1 mg Rinder Serumalbumin/ml und läßt über Nacht durch Diffusion eluieren. Vom Extrakt verwendet man 20 µl oder in manchen Versuchen 100 µl zum Test auf DNA-Polymeraseaktivität.

Die Scheibchen eines weiteren Gels wurden ohne Vorbehandlung auf ein SDS-Flachgel gegeben.

Die Proteinverteilung in den gefärbten Gelen wurde densitometrisch mit einem Helium-Neon-Laser-Scanner (633 nm) gemessen und aufgezeichnet.

2.27.2. Reelektrophorese

In manchen Fällen wurde das Scheibchen mit maximaler Aktivität erneut einer nicht-denaturierenden Elektrophorese im gleichen System unterworfen.

Nach der Vorelektrophorese schüttelt man den Elektrodenpuffer aus den Gelröhrchen heraus und pipettiert 20 µl Probenpuffer auf die Geloberfläche. Das aus einem gefrorenen Gel ausgeschnittene Scheibchen mit der höchsten Aktivität wird nun mit einer Pinzette luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit 20 µl Probenpuffer

überschichtet. Die Kammer wird mit Elektrodenpuffer gefüllt und die Elektrophorese wie oben beschrieben ausgeführt.

2.27.3. Präparative, nicht-denaturierende Elektrophorese

Um größere Volumen einer Enzympräparation der nicht-denaturierenden Elektrophorese unterwerfen zu können, wurde das System auf einen präparativen Maßstab erweitert. Verwendet wurde eine E-C Apparatur für ein Flachgel mit einem Querschnitt von 0,6 x 23 cm und einer Höhe von 18 cm. Auf dieses Gel können bis zu 8 ml aufgetragen werden ($\approx$ 5-10 mg Protein).

Zusammensetzung eines 7%igen Gels:

Ammediol	14,70 g
Acrylamid	23,85 g
Bisacrylamid	0,65 g
Glycerin	107 g ($\approx$ 87,5 ml)
1 N HCl bis pH 9,0	
Wasser ad	350 ml

Diese Lösung wird entgast und nacheinander 1,0 ml 10%ige Ammoniumpersulfat-Lösung und 0,1 ml TMED zugegeben. Sie wird bei leicht schräg gehaltener Elektrophoresekammer eingefüllt und nach Einlegen des Aussparungsblocks für den Auftrag läßt man in waagerechter Lage polymerisieren.

Vor Gebrauch wird überschüssiges Gel mit einem Spatel abgedrückt und der Aussparungsblock herausgenommen. Die Kammer wird vertikal gestellt, der Elektrodenpuffer eingefüllt und die beiden Kühlplatten an einen Kälte-Kleinthermostat angeschlossen, der auf 0-1°C eingestellt ist.

Nach Beendigung wurde das unterhalb der Laufront mit einer scharfen Kante abgedrückte Gel auf eine Plexiglasplatte geschoben. Nach Herausschneiden eines 6 mm breiten Streifens in der Mitte, der zum Anfärben verwendet wurde, sind beide Hälften über Trockeneis eingefroren worden. Aus dem hartgefrorenen Gel wurde ein weiterer 5-6 mm breiter Streifen mit einem Skalpell abgeschnitten und in 2,1 mm Scheibchen geteilt, die wie oben angegeben, extrahiert und auf DNA-Polymeraseaktivität getestet wurden. Die Scheibchen eines 3 mm breiten Streifens wurden ohne weitere Inkubation auf ein SDS-Plattengel gegeben.

2.28. Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierung in Röhrchen wurde im wesentlichen nach den Angaben von O'Farrell (75) ausgeführt.

Lösungen:

A: Acrylamid	30,5% (G/V)
B: N,N'-Methylenbisacrylamid	1,0% (G/V)
C: Riboflavin	0,004% (G/V)

Die Lösungen A und B können bei 4°C aufbewahrt werden, Lösung C ist frisch zuzubereiten.

Probenpuffer:

Glycin	1% (G/V)
β -Mercaptoäthanol	3 mM
Glycerin	20% (V/V)

Probenüberschichtungs-Lösung:

Ampholine pH 3,5-10	1% (G/V)
Glycerin	10% (G/V)

Bei -20°C aufbewahren.

Elektrodenlösungen:

Kathode: 0,1% Äthanolamin
Anode: 0,01 M Phosphorsäure

Mischung zur Herstellung eines 5%igen Gels für einen pH-Gradienten von 2,5-9,5:

Lösung A	3,2 ml
Lösung B	3,2 ml
Glycerin	4,0 g ($\hat{=}$ 3,2 ml)
Ampholine pH 3,5-10	0,83 ml
pH 4-6	0,06 ml
pH 5-7	0,06 ml
pH 9-11	0,20 ml
Wasser	9,4 ml

Das Gemisch wird entgast, 0,5 ml Lösung C hinzugefügt und mit einer Spritze 8 cm hoch in Röhrchen (0,5 x 10 cm) gefüllt. Man überschichtet mit 100 μ l Wasser oder Isobutanol und polymerisiert 3-4 Stunden lang durch UV-Bestrahlung. Nach dem Polymerisieren wird das Wasser oder das Isobutanol abgegossen und durch 10%iges Glycerin ersetzt. Die Gele sind eingeschweißt in Plastiktüten, bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, etwa einen Monat lang gebrauchsfähig. Die Gele wurden nach Vesterberg gefärbt (76).

Lösung A:

TCA	5/4 g
Sulfosalizylsäure	16,2 g
Methanol	135 ml
Wasser	322 ml

Lösung B:

Coomassie blau in Wasser 1%

Die Gele werden 30 min in Lösung A bewegt, über Nacht in einer Mischung A:B = 40:1 gefärbt und zum Entfärben in ein Gemisch von Essigsäure-Äthanol-Wasser im Verhältnis 8:25:65 gegeben.

Ausführung:

Isoelektrische Fokussierung wurde bei 4°C im Kältelabor durchgeführt.

Die Röhrchen fixiert man in einer Elektrophoreseapparatur und gibt auf die Geloberfläche 20 μ l Proben-überschichtungs-Lösung. In den unteren Elektrodenraum

(Anode) wird 0,01 M Phosphorsäure, in den oberen Elektrodenraum (Kathode) 0,1% Äthanolamin vorsichtig eingefüllt und noch in den Röhrchen enthaltene Luft behutsam herausgedrückt. Zur Vorfokussierung legt man für 30 min eine Spannung von 200 V an.

Die aufzutragende Probenlösung (50-300 µg Protein/ml) wird 5-6 Stunden gegen Probenpuffer dialysiert. Gute Dialyse ist wichtig, da auch eine geringe Salzkonzentration im Auftrag die Fokussierung stark beeinträchtigt. Danach gibt man 2% Ampholine pH 3,5-10 zur Probe hinzu.

Die obere Elektrodenflüssigkeit wird nach Beendigung der Vorfokussierung abgegossen und aus den Röhrchen gut herausgeschüttelt. Man trägt nun 50-100 µl Probe auf die Gele auf und überschichtet mit 20 µl Probenüberschichtungs-Lösung. Dann füllt man wieder frische Kathodenflüssigkeit ein, entfernt eventuell die Luft aus den Röhrchen und fokussiert drei Stunden lang mit 300 V konstanter Spannung.

Die Gele werden aus den Röhrchen entnommen und auf einer Glasplatte über Trockeneis eingefroren; eines davon wird nach Vesterberg gefärbt. Zwei weitere parallele Gele werden in 2,1 mm Scheibchen geschnitten und das eine extrahiert für DNA-Polymerasetest, wie unter nicht-denaturierender Elektrophorese beschrieben. Jedes Scheibchen des anderen Gels wird in ein Röhrchen (120 x 80 mm) mit 1 ml abgekochtem und wieder erkaltetem bidestilliertem Wasser gegeben und nach der Extraktion der Ampholine über Nacht in den einzelnen Fraktionen der pH mit einer Glaselektrode gemessen.

2.29. SDS-Elektrophorese

SDS-Elektrophorese wurde nach der Vorschrift von Le Stourgeon und Wray (77) in Anlehnung an die Methode

von Laemmli (78) ausgeführt. Als Trenngel wurde ein 11 x 12 cm großes Flachbettgel mit einem exponentiellen Gradienten von 5-20% verwendet.

Lösungen:

A: Tris (Base)	6,0 g
10%ige SDS-Lösung	4,0 ml
6 N HCl bis pH 6,8	
Wasser ad	100 ml
B: Acrylamid	30% (G/V)
N,N'-Methylenbis-acrylamid	0,8% (G/V)

Elektrodenpuffer:

Tris (Base)	0,025 M
Glycin pH 8,4	0,192 M
SDS	0,1 %

Probenpuffer:

Natriumphosphat-Puffer

pH 7,2	0,01 M
SDS	0,1 %
β -Mercaptoäthanol	0,14 M
Saccharose	0,25 M

0,01 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2:

0,01 M NaH_2PO_4	29,6 ml
0,01 M Na_2HPO_4	70,4 ml

Zusammensetzung des Trenngels(exponentieller Gradient 5-20%):

	5%	20%
Tris (Base)	4,60 g	11,4 g
Acrylamid	4,87 g	48,7 g
N,N'-Methylenbis-acrylamid	0,13 g	1,3 g
10%ige SDS Lösung	1 ml	2,5 ml
1 N Salzsäure bis pH 8,3		
Wasser ad	100 ml	250 ml

8 ml der 5%igen Lösung und 24 ml der 20%igen Lösung werden entgast und Ammoniumpersulfat und TMED nach folgendem Schema zugegeben.

	5%ig	20%ig
10% Ammoniumpersulfat	20 µl	80 µl
TMED	5 µl	5 µl

Zusammensetzung des Sammelgels:

Lösung A	1,25 ml
Lösung B	0,50 ml
Wasser	3,25 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,03 ml
TMED	0,01 ml

2.29.1. Herstellung des exponentiellen Gradienten (79)

Das Verhältnis von 5%iger Gellösung zur 20%igen soll im Gel 1:2 sein. Der exponentielle Gradient wird in der Weise hergestellt, daß in ein volumenkonstantes Mischgefäß, das luftblasenfrei mit der 5%igen Gellösung gefüllt ist, mittels einer 30 ml Spritze und einer Infusionspumpe die 20%ige Lösung mit einer Geschwindigkeit von 3,5 ml/min hineingepumpt und das Gemisch von unten in die senkrecht in der Elektrophoreseapparatur eingespannte Flachbett-kammer gedrückt wird.

Das Volumen der Kammer (1,5 x 110 x 120 mm) beträgt 24 ml, d.h. bei einem Verhältnis von 1:2 werden 8 ml 5%ige Lösung benötigt. Diese füllt man in das Mischgefäß. Da von der 20%igen Lösung am Ende wieder 8 ml dort zurückbleiben, werden 24 ml davon in eine Spritze aufgezogen, mit dem Mischgefäß luftblasenfrei verbunden und mittels der Infusionspumpe in das auf einem Magnetrührer stehende Mischgefäß gepumpt. Ist die Flachbett-kammer bis zur richtigen Höhe gefüllt, wird der Zulaufschlauch abgeklemmt und die Oberfläche vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach 30-60 min ist die Polymerisation beendet.

Das Wasser wird sorgfältig von der Geloberfläche abgossen, das Sammelgel eingefüllt und der "Kamm" mit den Aussparungen für den Auftrag eingesetzt. Das Sammelgel kann man in waagerechter Lage polymerisieren lassen.

Vor einem Elektrophoreselauf wird der "Kamm" und der untere Abstandshalter von der Flachbettkammer entfernt. In die mit Elektrodenpuffer gefüllte untere Elektrodenkammer wird das Gel luftblasenfrei eingetaucht und an der oberen Elektrodenkammer fixiert. Nach dem Füllen der oberen Kammer und dem Auftragen der Proben entwickelt man das Gel über Nacht mit 7-8 mA konstantem Strom. Die Gele werden nach Weber und Osborn gefärbt, wie unter nicht-denaturierenden Elektrophorese beschrieben.

9.2. Präparation von Protein für SDS-Elektrophorese

Zu einer Lösung, die zwischen 200 und 500 µg Protein/ml enthalten soll, gibt man mehrere Tropfen 10%ige SDS-Lösung, erhitzt 1-2 min im siedenden Wasserbad und dialysiert über Nacht gegen Probenpuffer. Die Proteinlösung darf keine K^+ -Ionen enthalten, da SDS mit K^+ einen schwerlöslichen Niederschlag bildet, der viel Protein mitreißen kann.

Um eine Oxidation von Thiolgruppen der Proteine zu Disulfidbrücken im Gel während der Elektrophorese zu verhindern, was auf Grund des restlichen Ammoniumpersulfats als Polymerisationsstarter möglich wäre, wurden die Eichproteine (β -Galaktosidase, Phosphorylase a, Fumarase, Pyruvat-Kinase, Aldolase) mit Jodacetamid alkyliert.

Die Proteinlösung (1 mg/ml) wird mit dem gleichen Volumen 1 M Tris HCl pH 8,2 und wenigen Tropfen 10%iger SDS-Lösung versetzt und 1-2 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Zur Reduktion wird nun β -Mercaptoäthanol bis zu einer Endkonzentration von 0,75 M zugegeben und 1-4 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von Jodacetamid bis zur Endkonzentration von 1 M läßt man eine Stunde bei

0°C alkylieren. Die Proben werden gegen einen Puffer dialysiert, der 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2, 0,1% SDS und 0,25 M Saccharose enthält. Man engt ein, bis die Proteinkonzentration zwischen 200 und 500 µg/ml liegt.

Die Scheibchen aus der nicht-denaturierenden Elektrophorese wurden ohne weitere Vorbereitung auf ein SDS Gel gegeben. In manchen Fällen wurden auf die Scheibchen 1-2 Tropfen 10%ige SDS-Lösung getropft und 1-2 Stunden stehen gelassen. Ein Unterschied im Bandenmuster konnte nicht festgestellt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Anreicherung von DNA-Polymerase

Eine Übersicht der Reinigungsschritte ist in Tab. 3 dargestellt. Alle Prozeduren wurden bei 0-4°C ausgeführt.

3.1.1. Präparation von Schritt-1 Enzym:

Logarithmisch wachsende Mikroplasmodien aus etwa 20 Schüttelflaschen wurden durch Zentrifugation (250 x g, 1 min, IEC Zentrifuge) vom Medium befreit, in 5 Volumenteilen Puffer 1 suspendiert, wie zuvor abzentrifugiert, noch einmal in Puffer 1 mit 1 mM PMSF suspendiert und bei 1500 x g für 1 min abzentrifugiert. Das Gewicht dieses Niederschlags wurde als Frischgewicht genommen, das üblicherweise bei etwa 150 g lag.

Die Mikroplasmodien wurden mit 5 Volumenteilen Puffer 1, der 1 mM PMSF enthielt, in einem Braun-Mixer für 30 s bei 11 000 Upm homogenisiert. Nach 30 min wurde der Schaum verworfen und das Homogenat bei 50 000 Upm (160 000 x g) eine Stunde in einer IEC D60 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (Schritt-1 Enzym) wurde gegen trockenes PEG 20 000 auf 1/10 eingengt (16-20 Stunden).

3.1.2. Gelfiltration an Sepharose CL 6B

Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation bei 2200 x g für 10 min (IEC-Zentrifuge) geklärt. Etwa 50-80 ml dieser Lösung, die ungefähr 1-2 g Protein enthielt, wurden auf eine Sepharose CL 6B Säule mit den Maßen 7 x 62 cm aufgetragen. Zur Elution wurde Puffer 2 verwendet; 30 ml Fraktionen wurden gesammelt. Die Polymeraseaktivität erschien vor der Hauptmenge des Proteins (s. Abb. 5). Im Ausschlußvolumen der Säule fand sich nur eine geringe Enzymaktivität. Das Aktivitätsmaximum mit

Tab. 3:

Partielle Reinigung von DNA-Polymerase aus exponentiell wachsenden Mikrop lasmodien von Physarum. Die Werte sind auf 100 g Frischgewicht bezogen. Eine Einheit ist definiert als der Einbau von 1 nMol [^3H]dTMP in säureunlösliches Material/30 min im Standardansatz (s. Abschnitt 2.15), der 15 μM dTTP enthält. Ähnliche Einbauraten ergaben sich bei Verwendung von 3 μM dTTP. Die Aktivitäten wurden aus den Proben bestimmt, die für den darauffolgenden Schritt verwendet wurden. Die hohe scheinbare Ausbeute im Schritt-3 Enzym kann durch Abtrennung eines Hemmstoffes verursacht sein.

Schritt	Fraktion	Volumen		Protein		Aktivität	spezifische Aktivität	Anreicherungs-faktor	Ausbeute
		ml		mg					
1	160 000 x g Überstand	460		900 ¹⁾		45	0,05	1	100
2	Sepharose CL 6B	400		240		26	0,11	2	58
3	DEAE-Sephadex A25	30		100		90	0,9	18	200
4	DNA-Cellulose	30		4		30	7,5	150	67
5	DEAE-Sephadex A25	10		0,25		18	72	1440	40

¹⁾ Protein nach Neßler bestimmt.

einem $V_e/V_o = 1,49$ hatte ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 900 000. Dieses hohe scheinbare Molekulargewicht wurde aber nur zu Beginn der Aufarbeitung und bei niedrigen Ionenstärken gefunden.

Das zwischen einem $V_e/V_o = 1,3 - 1,9$ eluierte Material wurde gepoolt (Schritt-2 Enzym). Der Quotient OD_{280}/OD_{260} betrug 1,24, was einem Nukleinsäureanteil von 1,6% entspricht (69).

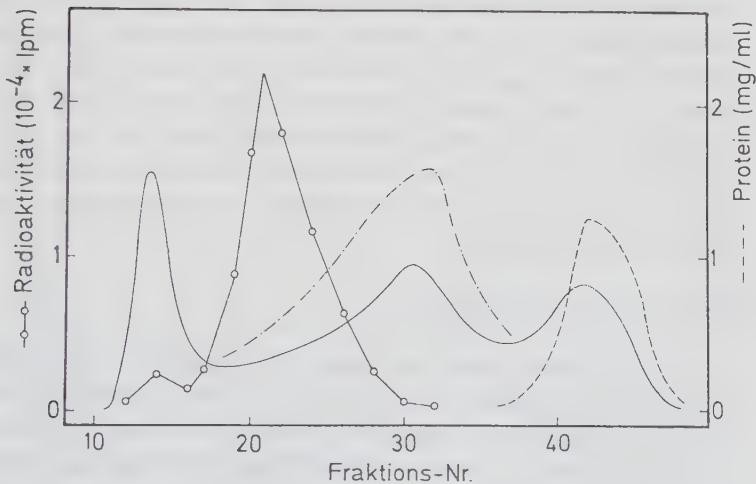


Abb. 5: Elutionsdiagramm der präparativen Sepharose CL 6B Säule

Die Transmission bei 280 nm (—) und die Extinktion bei 380 nm (----) sind in relativen Einheiten angegeben.

Das Protein wurde nach Lowry bestimmt.

3.1.3. DEAE-Sephadex A25 Chromatografie I

Schritt-2 Enzym wurde auf eine DEAE-Sephadex A25 Säule gegeben, die zuvor über Nacht mit Puffer 2 äquilibriert wurde. Ungefähr 1 ml Säulenvolumen/ 1 g Frischgewicht wurde verwendet. Der Durchlauf enthielt 10% der wiedergefundenen Aktivität und 40% des Proteins. Nach dem Waschen der Säule mit etwa dem doppelten Säulenvolumen Puffer 2 wurde mit 0,25 M Kaliumchlorid in Puffer 2 eluiert. Material, das bei 280 nm absorbiert, erschien in zwei gut getrennten Gipfeln. Der erste enthielt 80% der wiedergefundenen Aktivität und wurde gepoolt, gegen trockenes PEG eingeeengt, gegen Puffer 2 dialysiert und zur Klärung 20 min bei $2200 \times g$ zentrifugiert (Schritt-3 Enzym). Das OD_{280}/OD_{260} -Verhältnis dieser Fraktion betrug 1,57, was einem Nukleinsäureanteil von 0,45% entspricht (69). Der zweite Gipfel, der etwa 10% der Aktivität enthielt, wurde verworfen. Durch Kaliumchloridkonzentrationen bis zu 0,5 M wurden keine weiteren Aktivitäten mehr eluiert.

3.1.4. DNA-Cellulose Chromatografie

Schritt-3 Enzym wurde an einer DNA-Cellulose Säule adsorbiert, deren Volumen etwa 0,2 ml/1 g Frischgewicht betrug. Die Säule wurde mit Puffer 2 gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm die Grundlinie erreichte. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten, bestehend aus 5 Säulenvolumen Puffer 2 und 5 Säulenvolumen 0,4 M Kaliumchlorid in Puffer 2. Fraktionen von 1/3 des Säulenvolumens wurden gesammelt. Das Profil der Enzymaktivität war nicht einheitlich. Die zwischen 0,22 und 0,3 M Kaliumchlorid (18,5-24,5 mS/cm) eluierenden Fraktionen wurden gepoolt, gegen Puffer 2 dialysiert und Schritt-4 Enzym genannt (s. Abb. 6).

In einigen Experimenten wurden auch Enzymspezies beobachtet, die zwischen 0,15 und 0,20 M Kaliumchlorid (13-17 mS/cm) und über 0,3 M (25 mS/cm) eluierten. Die Menge dieser Aktivitäten variierte in unvorhersehbarer Weise. Diese Spezies wurden nicht weiter untersucht. Schritt-4 Enzym wurde in einigen Versuchen an DNA-Cellulose rechromatografiert und an der gleichen Stelle wiedergefunden (s. Abb. 7). Mit dieser Säule konnte eine bis zu 50-fache Anreicherung erzielt werden.

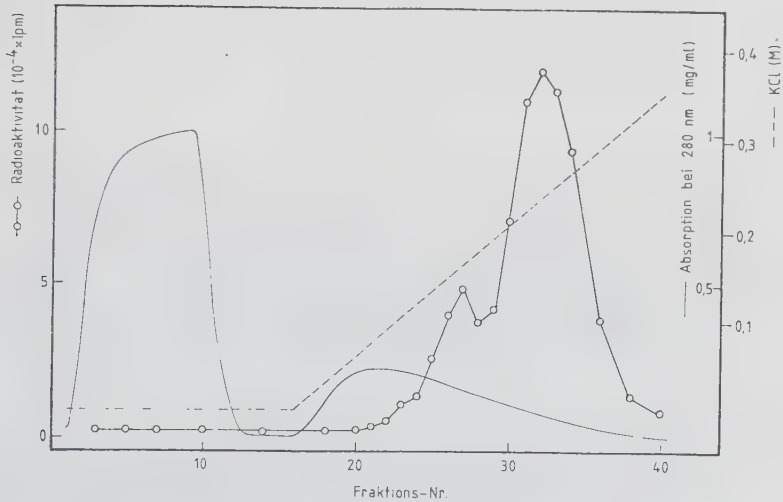


Abb. 6: DNA-Cellulose Chromatografie. Schritt-3 Enzym (166 mg Protein; 162 Einheiten) wurde auf eine DNA-Cellulose Säule gegeben (2,5 x 4 cm) und die Chromatografie wie beschrieben ausgeführt. Die Fraktionen 30-36 wurden gepoolt. Die Ausbeute betrug 70%.

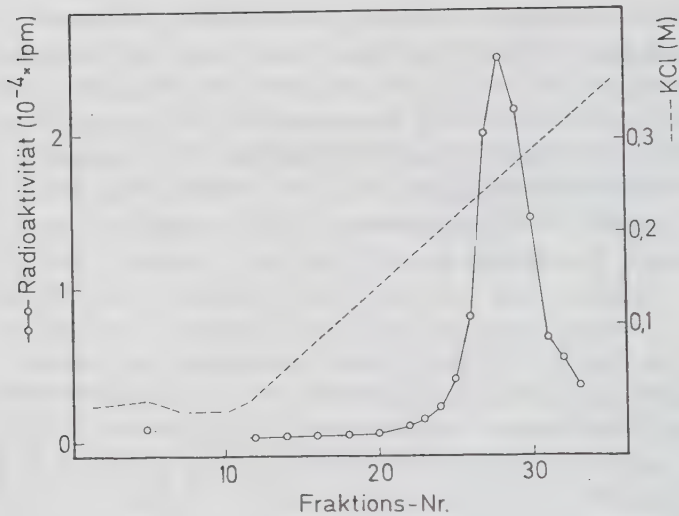


Abb. 7: Rechromatografie eines Pools zwischen 0,23 M und 0,29 M Kaliumchlorid (Maximum 0,25 M) aus dem Gradienten einer DNA-Cellulose Säule. Aufgetragen wurden 52 Einheiten (3,25 mg Protein), die Ausbeute war 50%.

3.1.5. DEAE-Sephadex A25 Chromatografie II

Schritt-4 Enzym wurde an einer DEAE-Sephadex A25 Säule adsorbiert, deren Volumen etwa 0,05 ml/ 1 g Frischgewicht betrug. Nach dem Auftrag wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer 2 gewaschen. Ein linearer Gradient bis 0,2 M Kaliumchlorid in Puffer 2 von insgesamt 6 Säulenvolumen wurde angelegt und Fraktionen von 3 ml gesammelt. Die Hauptaktivität eluierte in einem Gipfel bei 90 mM Kaliumchlorid (9 mS/cm; s. Abb. 8). Die Gipfelfraktionen wurden gepoolt, dialysiert gegen Puffer 2 und als Schritt-5 Enzym bezeichnet. Mit dieser Präparation, die bei 4°C aufbewahrt wurde, sind alle weiteren Versuche ausgeführt worden

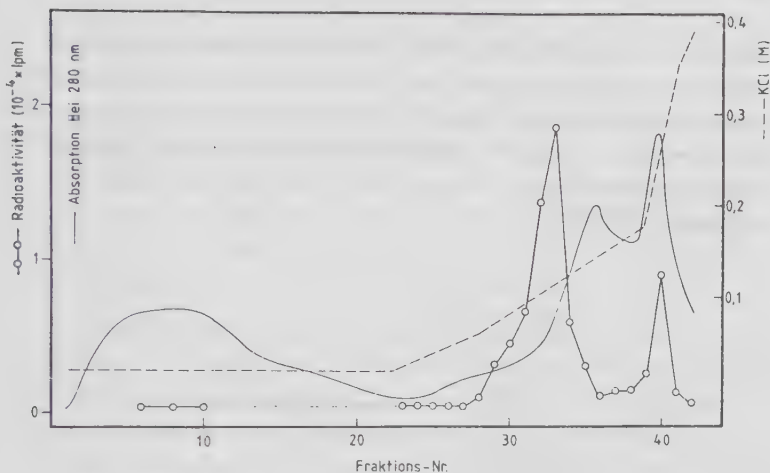


Abb. 8: DEAE-Sephadex Chromatografie II. Schritt-4 Enzym (16 Einheiten, 1,1 mg Protein) wurde auf eine DEAE-Sephadex A25 Säule (1,5 x 6,5 cm) gegeben. Die Fraktionen 30-34 wurden gepoolt, die Ausbeute war 40%.

Mit dieser Art der Aufarbeitung konnte eine 1400-fache Anreicherung erzielt werden. Die Gesamtausbeute an Enzym reichte für eine weitere Reinigung jedoch nicht mehr aus.

Nach der DEAE-Sephadex A25 Chromatografie I stieg die Gesamtaktivität an, wahrscheinlich durch Abtrennen eines Inhibitors.

3.2. Physikalische Parameter der DNA-Polymerase

Wenn von einem Protein der Stokessche Radius, der Sedimentationskoeffizient und das partialspezifische Volumen bekannt sind, dann kann man daraus das Molekulargewicht M_r und den Reibungskoeffizienten f/f_0 eines Makromoleküls unter Verwendung folgender Formeln berechnen (57,58).

$$M_r = \frac{6\pi\eta N_a s a}{1 - v_2 \rho} \quad (1)$$

$$f/f_0 = \frac{a}{\sqrt[3]{\frac{3 v_2 M_r}{4\pi N_a}}} \quad (2)$$

- a Stokesscher Radius
- s Sedimentationskoeffizient
- v_2 Partialspezifisches Volumen
- η Viskosität von Wasser bei 20°C
- ρ Dichte von Wasser bei 20°C

Der Stokessche Radius kann mit Hilfe der Gelfiltration ermittelt werden (s. Abb. 9), der Sedimentationskoeffizient durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Für das partialspezifische Volumen v_2 der DNA-Polymerase wurde 0,725 ml/g, ein typischer Wert für Proteine, eingesetzt (61). Diese Annahme wird gerechtfertigt durch die Beobachtung, daß die Schwimmdichte in Metrizamide- $^2\text{H}_2\text{O}$ Gradienten nahe der von β -Galaktosidase liegt (47). Dieser Befund spricht gegen die Anwesenheit von Zuckern oder Lipiden in der DNA-Polymerase. Auch das fehlende Bindungsvermögen an Con A (93) deutet auf die Abwesenheit von Zuckerresten.

Bei der Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten (s. Abb. 11) und des Elutionsvolumens (s. Abb. 10) von Schritt-5 Enzym traten verschiedene Formen der DNA-Polymeraseaktivität auf (Tab. 4). In den meisten Fällen kamen die Formen A und B vor, mit einem berechneten Molekulargewicht von 204 000 und 116 000. Manchmal erschien ein dritter Gipfel mit DNA-Polymeraseaktivität (s. Abb. 10 A). Diese Form C konnte nach Rechromatografie klar von der Form B unterschieden werden (s. Abb. 10 B).

Nach Gelfiltration und Gradientenzentrifugation von Schritt-1 Enzym erschien über 90% der wiedergefundenen Aktivität als Form A. Erhöhte Salzkonzentration (0,8 M Kaliumchlorid in Puffer 2) änderte den Sedimentationskoeffizienten von Schritt-1 Enzym nicht, was vermuten läßt, daß diese Form auch in vivo vorkommt. Die Aktivität dieser Enzympräparation wurde in Gegenwart von 2,5 mM Spermidin getestet, um eine genügende Einbaugeschwindigkeit zu erreichen. Auch das Sedimentationsverhalten von Schritt-5 Enzym änderte sich durch 0,8 M Kaliumchlorid in Puffer 2 gegenüber 0,4 M nicht.

Die beiden kleineren Formen der DNA-Polymeraseaktivität, die im Schritt-5 Enzym gefunden wurden, könnten Abbauprodukte darstellen, die im Laufe der Präparation entstanden sind.

Zwei Arten des Abbaus sind denkbar. Zum einen können proteolytische Enzyme, die durch PMSF nicht gehemmt werden, die Ursache sein, zum anderen kann man sich auch vorstellen, daß im Laufe der Anreicherung eine Reihe von Proteinfaktoren entfernt wurden oder der Enzymkomplex leichter dissoziiert. Beispiele für enzymatischen Abbau sind die Umwandlung von 7,3 S DNA-Polymerase zu einer 5,5 S Form, wie es bei *Drosophila* Embryonen gezeigt wurde (80).

Ein weiteres Beispiel ist die enzymatische Spaltung von *E.coli* DNA-Polymerase I mit Trypsin in zwei Teile, deren

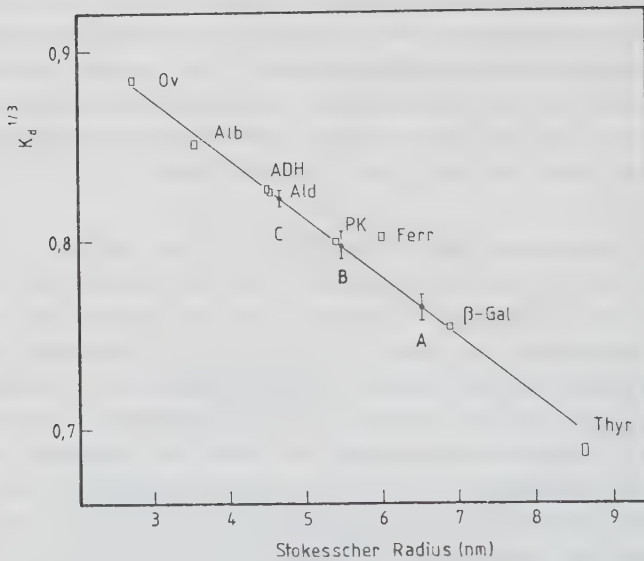


Abb. 9: Stokessche Radien der drei Formen A, B und C der DNA-Polymerase (s. Tab. 4). Angaben zu den Markerproteinen siehe Abb. 3.

eines die Exonukleaseaktivität und das andere die Polymeraseaktivität besitzt (10).

Andererseits stellt das E.coli DNA-Polymerase III-Holoenzym ein Beispiel für die Existenz verschiedener Untereinheiten dar, die unter bestimmten Bedingungen dissoziieren (10, 81).

Der Reibungsquotient aller drei Formen von Schritt-5 Enzym liegt zwischen 1,68 und 1,70 (s. Tab. 4). Ein Wert von 1,66 wurde für eine DNA-Polymerase Präparation aus Rattenleber

Tab. 4: Physikalische Parameter der DNA-Polymerase.

Das Elutionsvolumen V_e wurde aus einer Sepharose 6B Säule erhalten, wie unter Material und Methoden beschrieben. Der Verteilungskoeffizient K_d (58,59) wurde berechnet unter Verwendung der Werte $V_o = 41,4$ ml und $V_i = 117,7$ ml. Der Stokesche Radius wurde aus Abb. 9 grafisch entnommen. Bestimmungen von $s_{20,w}$ wurden ausgeführt, wie unter Material und Methodisch und Abb. 11 angegeben. Entsprechend den Gleichungen (1) und (2) wurden das Molekulargewicht und der Reibungsquotient berechnet. Berücksichtigt man die Standardabweichungen von a und $s_{20,w}$, so bewegt sich der Fehler des berechneten Molekulargewichtes innerhalb der 10% Grenze. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Ziffern in Klammern geben die Zahl der Experimente an.

Parameter	Einheit	Form A			Form B		Form C	
		75,5 ± 1,0	(3)	80,1 ± 1,1	(5)	83,8 ± 0,7	(2)	
Elutionsvolumen V_e	(ml)							
Verteilungskoeffizient K_d		0,446 ± 0,012		0,507 ± 0,014		0,556 ± 0,009		
Apparentes Molekulargewicht	($\times 10^{-3}$)	440 ± 50		250 ± 30		160 ± 15		
Stokescher Radius	(nm)	6,5 ± 0,2		5,5 ± 0,2		4,7 ± 0,15		
Sedimentationskoeffizient $s_{20,w}$	(S)	7,6 ± 0,3	(11)	5,2 ± 0,5	(10)	3,8 ± 0,3	(2)	
Molekulargewicht		204 000		116 000		73 000		
Reibungsquotient f/f_o		1,68		1,70		1,69		

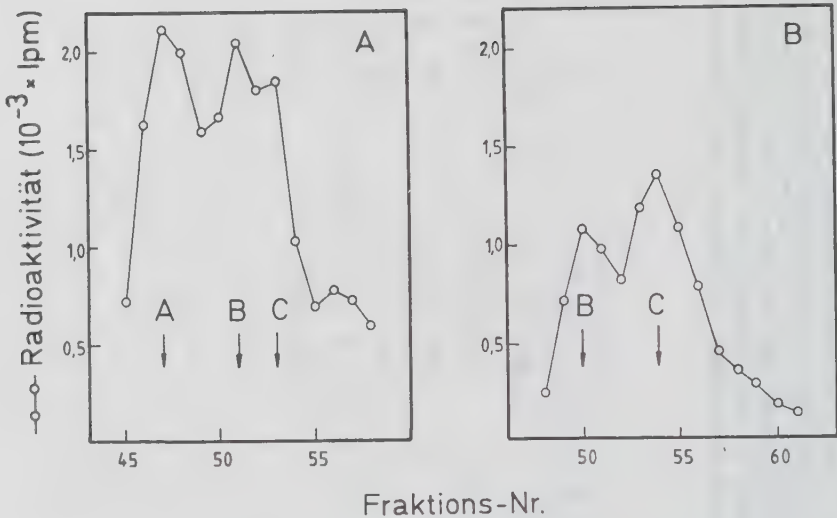


Abb. 10: Gelfiltration von Schritt-5 Enzym.

A) 1 ml ($\approx 1,3$ Einheiten) von Schritt-5 Enzym wurden an einer Sepharose 6B Säule chromatografiert, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Pfeile zeigen auf die Punkte mit den Elutionsvolumen 75,8 ml (Form A), 81,5 ml (Form B) und 84,3 ml (Form C). Die Ausbeute betrug 65%. Von zwei Läufen wurden die Fraktionen 49-52 mit einem Gesamtvolumen von 8,5 ml gepoolt und gegen PEG eingeeengt.

B) Der konzentrierte Pool mit einem Volumen von 1,5 ml (1,1 Einheit) wurde auf dieselbe Säule aufgetragen. Die Ausbeute war 34%. Die Elutionsvolumen von 78,1 ml (Form B) und 83,3 ml (Form C) sind durch Pfeile angezeigt.

gefunden (82). Ein hoher Reibungsquotient weist auf eine asymmetrische Struktur eines Proteins hin wie beispielsweise beim Gen-32 Protein des Phagen T4 und/oder auf eine voluminöse, stark hydratisierte molekulare Form. Die letztere Möglichkeit wird durch das Beispiel der RNA-Polymerase aus E.coli gestützt, deren aufgelockerte Molekularstruktur primär einer starken Hydratation und Durchdringung mit Lösungsmittel zuzuschreiben ist (83).

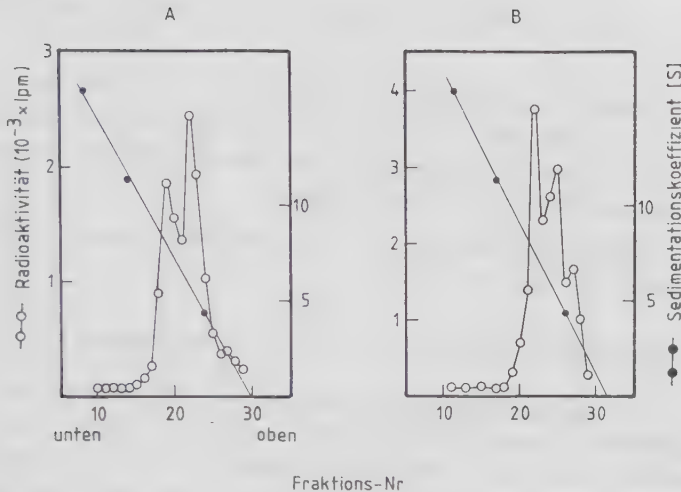


Abb. 11: Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Die Ausführung geschah wie in Material und Methoden beschrieben. Die Ausbeute betrug 25%.

A) 250 μl Schritt-5 Enzym (6 μg Protein, 0,18 Einheiten) wurden auf den Gradienten aufgetragen. Als Sedimentationskoeffizienten fanden sich 7,8 S (Form A) und 5,6 S (Form B).

B) 250 μl einer anderen Präparation von Schritt-5 Enzym (7 μg Protein, 0,3 Einheiten) wurden auf den Gradienten gegeben. Die gefundenen Sedimentationskoeffizienten waren 7,4 S (Form A), 5,0 S (Form B) und 3,5 S (Form C).

Kein signifikanter Unterschied in der Lage der Polymeraseaktivitäten ergab sich bei An- oder Abwesenheit von 2 mM Spermidin im Standardtest. In 9 von 12 Bestimmungen des Sedimentationskoeffizienten wurden nur die Formen A und B beobachtet. In einem der 12 Experimente erschien Form C als Gipfel, in 2 als Schulter.

3.3. Charakterisierung der katalytischen Aktivität des Enzyms

3.3.1. Zeitabhängigkeit des Einbaus von [^3H] dTMP in aktivierte DNA

Aus einem Gesamtansatz, der 140 mM K^+ und 5 mM Mg^{++} enthielt, wurden nach 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min je 3 x 100 μl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 3 ml eiskalter 0,5 M PCA gestoppt.

Die Einbaurrate war bis zu einer Inkubationszeit von 60 min linear (s. Abb. 12).

3.3.2. Temperaturabhängigkeit der DNA-Polymeraseaktivität

Je drei Ansätze wurden 30 min bei 0, 17, 27, 37 und 45°C inkubiert. Durch Änderung der Temperatur von 27 auf 37°C erhöhte sich der Einbau auf das 1,8-fache. Keine weitere Stimulierung ergab sich bei Erhöhung auf 45°C (s. Abb. 13). Als Standard-Inkubationstemperatur wurde 27°C gewählt, da bei dieser Temperatur *Physarum polycephalum* eine optimale Wachstumsgeschwindigkeit zeigt (49).

3.3.3. Abhängigkeit des [^3H] dTMP-Einbaus von der Enzymmenge und der An- oder Abwesenheit von 2 mM Spermidin

Zu Ansätzen mit 140 mM K^+ und 5 mM Mg^{++} Endkonzentration einmal ohne und einmal mit 2 mM Spermidin wurden steigende Mengen (0,0035 - 0,04 Einheiten) einer Enzympräparation gegeben.

Ohne Spermidin ergab sich eine exponentielle Kurve, die bei Anwesenheit von 2 mM Spermidin in eine lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Enzymkonzentration überging (s. Abb. 14). Dieses Verhalten konnte durch vier Versuche bestätigt werden.

Ein ähnlicher Effekt wurde mit DNA-Polymerase B aus dem Gehirn von Ratten gefunden (84).

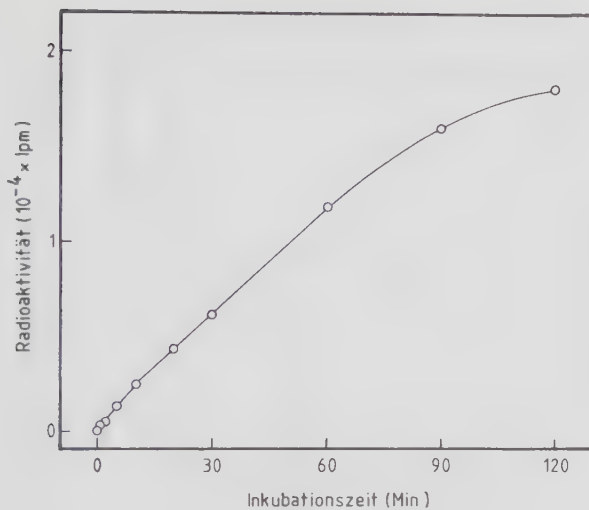


Abb. 12: Zeitabhängigkeit des Einbaus von $[^3\text{H}]$ dTMP in aktivierte DNA

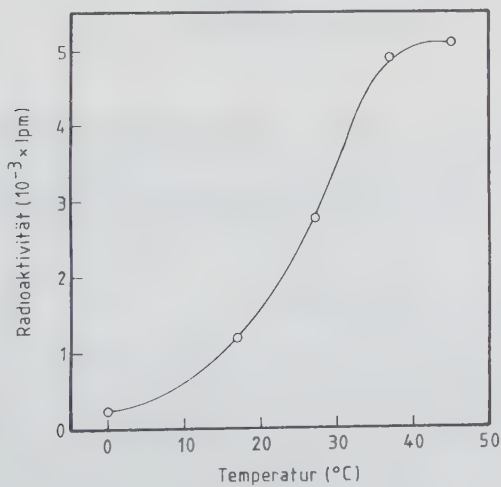


Abb. 13: Temperaturabhängigkeit der DNA-Polymeraseaktivität

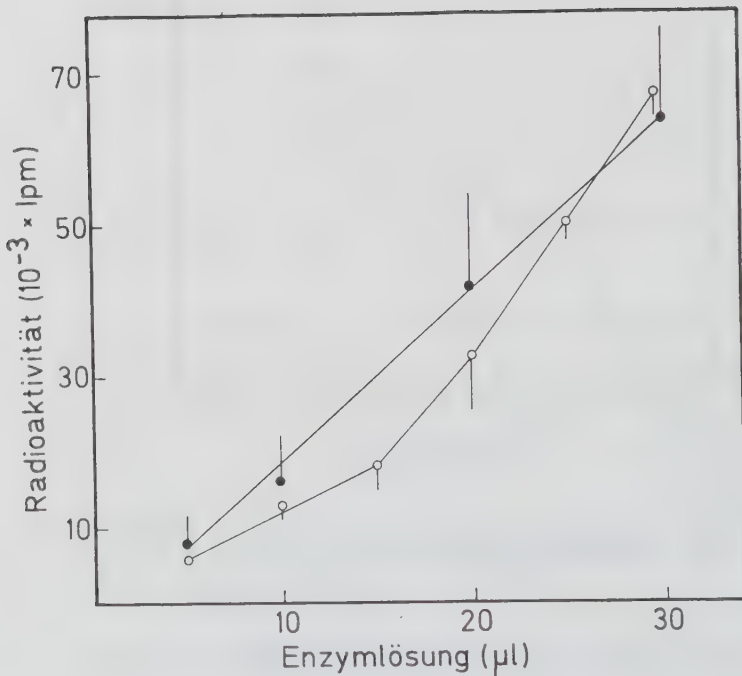


Abb. 14: Abhängigkeit des [^3H] dTMP Einbaus von der Enzymkonzentration in An- oder Abwesenheit von 2 mM Spermidin.
(●—●) mit Spermidin; (○—○) ohne Spermidin. Die Meßwerte sind mit Standardabweichung angegeben.

3.3.4. pH-Optimum der Enzymaktivität

Das pH-Optimum wurde bestimmt durch Verwendung von je 50 mM MOPS-KOH, Tris-HCl und Ammediol-HCl als Puffer. Alle Tests wurden bei konstanter Konzentration von 140 mM K^+ und 5 mM Mg^{++} ausgeführt. Dabei zeigte das Enzym im Bereich von pH 7,2-8,3 optimale Enzymaktivität (s. Abb. 15). Bei Verwendung von MOPS als Puffersubstanz lagen die Einbauraten im Bereich von pH 7,5-8,3 höher als bei Tris und Ammediol.

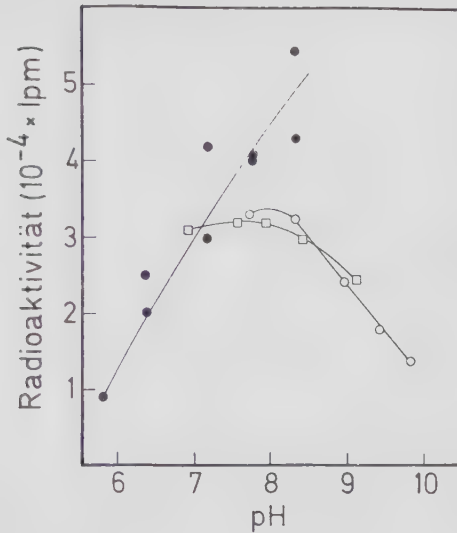


Abb. 15: pH-Optimum der DNA-Polymerase.

(●—●) MOPS-KOH; (□—□) Tris-HCl;

(○—○) Ammediol-HCl.

3.3.5. Wirkung von K⁺- und Mg⁺⁺-Ionen

Mg⁺⁺- oder Mn⁺⁺-Ionen sind essentiell für die Aktivität der DNA-Polymerase. Wie Abb. 16 zeigt, ist die optimale Mg⁺⁺-Konzentration abhängig von der K⁺-Menge. Bei 150 mM K⁺ begünstigen niedrige Konzentrationen von Mg⁺⁺ die Enzymaktivität. Halbmaximale Aktivität erhält man bei 0,6 mM Mg⁺⁺, maximale bei 2,5 mM. Reduziert man die K⁺-Konzentration, so benötigt man für maximalen Einbau eine höhere Mg⁺⁺-Menge. Die Ionenstärke der entsprechenden Aktivitätsmaxima der DNA-Polymerase ist nicht konstant, sondern fällt von 0,158 bei 0,625 mM Mg⁺⁺ auf 0,1 bei 20 mM Mg⁺⁺ (s. Tab. 5).

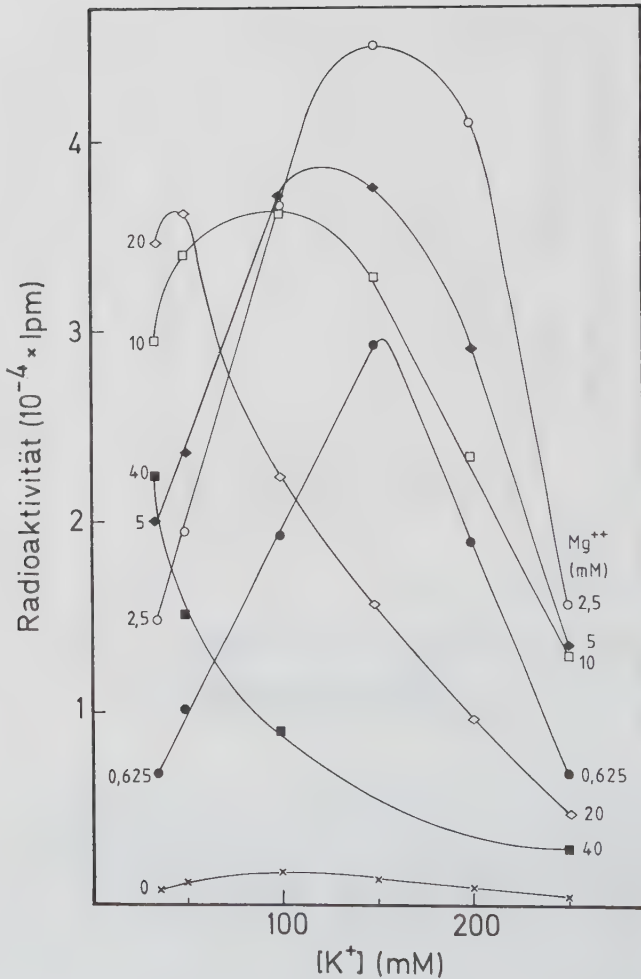


Abb. 16: Einfluß verschiedener Konzentrationen von Kaliumchlorid und Magnesiumacetat auf den Einbau von $[^3H]$ dTMP. Der Test wurde wie unter Material und Methoden beschrieben ausgeführt, mit Ausnahme der verschiedenen Konzentrationen von K^+ und Mg^{++} . Bei 0 mM Mg^{++} waren möglicherweise Spuren des Kations vorhanden. Ein Komplexbildner für Mg^{++} wurde nicht verwendet.

Tab. 5: Ionenstärke bei den Maxima der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Mg^{++} - und K^{+} -Konzentration. Die Werte wurden von den Maxima in Abb. 16 entnommen.

Mg^{++}	K^{+}	Ionenstärke
mM	mM	
0,625	156	0,158
2,5	150	0,158
5	120	0,135
10	90	0,120
20	40	0,100

3.3.6. Wirkung von Starter-Matrizen

Wie Tabelle 6 zeigt, stellt aktivierte DNA die effektivste Starter-Matrize dar. Nicht akzeptiert wird $p(A) \cdot (dT)_{12}$, auch nicht in Anwesenheit von Mn^{++} , einer Bedingung, die DNA-Polymerase- γ begünstigt (33). In dieser Hinsicht verhält sich Schritt-5 Enzym ähnlich der DNA-Polymerase- α aus höheren Eukaryonten. Als Starter-Matrize werden $p(dA) \cdot (rU)_{12-18}$ und $p(dA) \cdot (dT)_{12}$ kaum akzeptiert.

Für aktivierte DNA wurde die Michaelis-Konstante K_m bestimmt. Die Berechnung aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm ergab einen K_m -Wert von 50 $\mu g/ml$ bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V von 86 Einheiten/mg Protein (s. Abb. 17).

3.3.7. Wirkung von Desoxynukleosid-5'-triphosphaten

Weglassen von dATP, dCTP und dGTP aus dem Standardtest führte zu einem um 85% verminderten Einbau von dTMP. In der Literatur wurde von Unterschieden in der Einbauverminderung berichtet, die vom Grad der Aktivierung der DNA und von der Ionenstärke abhängig waren (85). Sie konnten nicht signifikant erhärtet werden. Eine Michaelis-Konstante

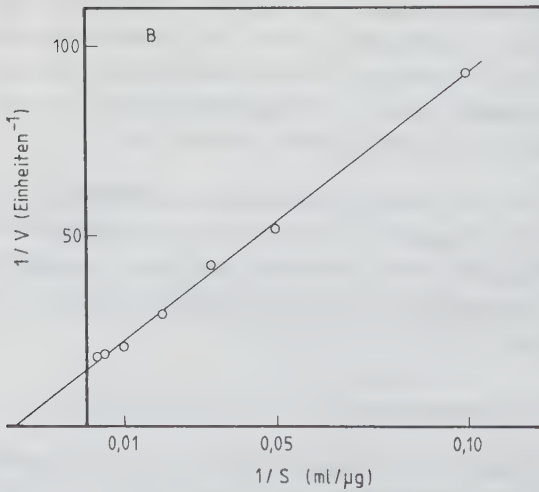
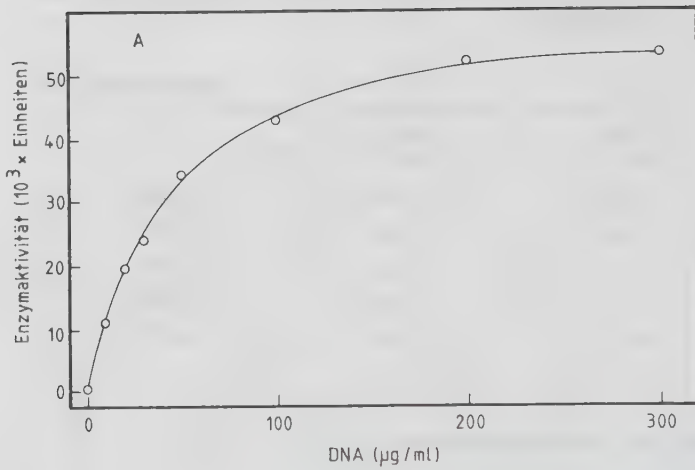


Abb. 17: K_m -Wert für aktivierte DNA

A) Michaelis-Menten-Diagramm

B) Lineweaver-Burk-Diagramm; $1/K_m = 0,0192$ (ml/ μg)
 $K_m = 52$ ($\mu\text{g/ml}$).

Tab. 6: Effektivität von Starter-Matrizen

Aktivierter DNA (12,5 µg pro Ansatz) wurde durch die gleiche Menge anderer Polynukleotide ersetzt. Lachssperma DNA wurde denaturiert durch 10 min langes Erhitzen auf 80°C und anschließende rasche Abkühlung. Das Basenverhältnis der synthetischen Polynukleotide war 1:1. Die Konzentration von [³H] dTTP war 15 µM, die von Kaliumchlorid 150 mM, Magnesiumacetat 5 mM und Manganchlorid 0,5 mM.

Starter-Matrize	Aktivität	
	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺
	%	%
aktivierte DNA	100	4
native Lachssperma DNA	2	1
denaturierte Lachssperma DNA	8	1
p(dA)·(dT) ₁₂	4	1
p(dA)·(rU) ₁₂₋₁₈	3	1
p(A)·(dT) ₁₂	1,5	0

wurde einmal für alle vier Desoxynukleosid-5'-triphosphate bestimmt, zum anderen nur für dTTP bei Konstanthaltung der übrigen drei. Äquimolare Konzentrationen aller vier dNTP von 0,033 µM bis 33 µM wurden angeboten und die Einbaugeschwindigkeit gemessen. Aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm wurde der K_m-Wert zu 3 µM/Desoxynukleosid-5'-triphosphat berechnet. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V betrug 180 Einheiten/mg Protein (s. Abb. 18). Die spezifische Aktivität von Schritt-5 Enzym unter optimalen Bedingungen war so wenigstens doppelt so hoch wie im Standardansatz. Die Michaelis-Konstante K_m für dTTP allein, bei einer gleich-

bleibenden 50 μM Konzentration der anderen drei Desoxynukleosid-5'-triphosphate war 2 μM . Mengen von 0,033 - 33 μM dTTP wurden angeboten, die Einbaugeschwindigkeit gemessen und in einem Wolff-Diagramm aufgetragen (s. Abb. 19). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 67 Einheiten/mg Protein.

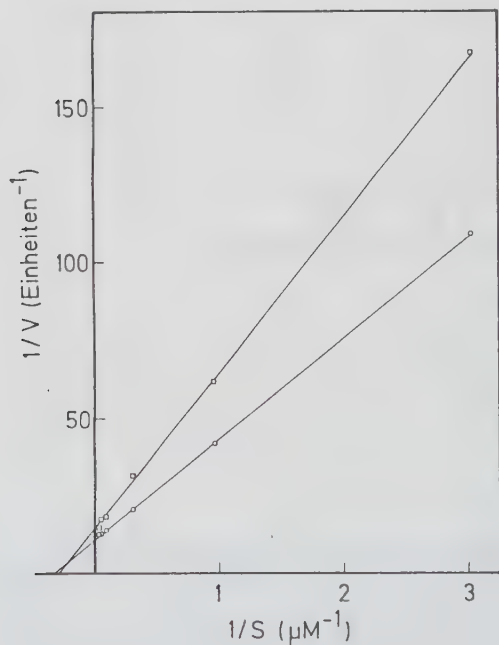


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten der vier Desoxynukleosid-5'-triphosphate. Aus zwei Versuchen wurde ein K_m -Wert von 3 μM ermittelt. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten waren 180 und 140 Einheiten/ mg Protein.

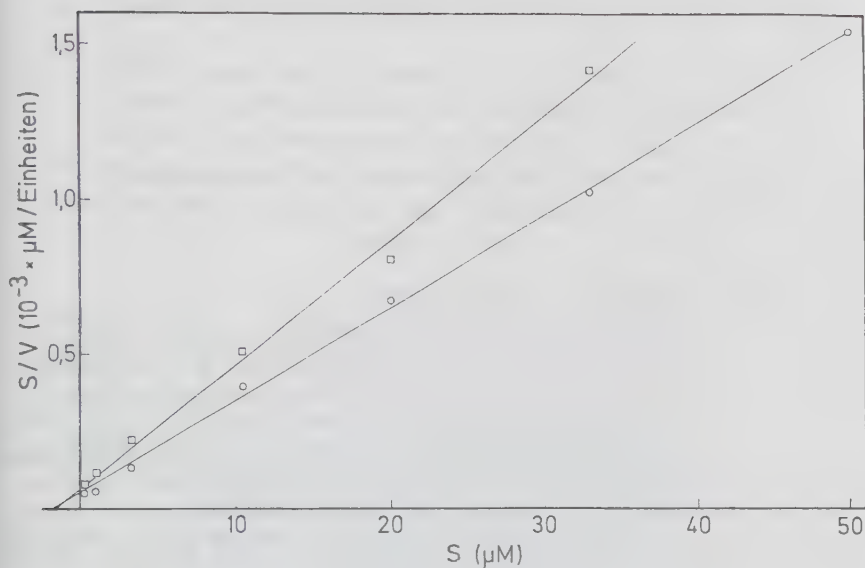


Abb. 19: Wolff-Diagramm zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten von dTTP bei konstanter 50 μM Konzentration der drei restlichen Desoxynukleosid-5'-triphosphate. Aus zwei Versuchen wurde ein K_m -Wert von 2 μM ermittelt. Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten waren 50 und 67 Einheiten/mg Protein.

3.3.8. Inhibitoren

Tabelle 7 zeigt die Wirkung von Inhibitoren auf DNA-Polymerase. Das Enzym ist sensitiv gegenüber N-Äthylmaleinimid, obwohl die notwendige Konzentration höher liegt als zur Hemmung der hochmolekularen DNA-Polymerase aus anderen Eukaryonten notwendig ist. DNA-Polymerase- α aus Säugern wird vollständig durch 1 mM N-Äthylmaleinimid gehemmt (23) und eine ähnliche Konzentration führt in der Bäckerhefe zu einer Hemmung von 80% (24). Im Gegensatz zu dieser Be-

obachtung an anderen Polymerasen, hemmen 10 mM N-Äthylmaleinimid die α -Polymerase aus der menschlichen Plazenta nur zu 10% (86).

Bei Physarum konnten Unterschiede in der Hemmbarkeit zwischen Schritt-1 Enzym und Schritt-5 Enzym nicht gefunden werden, auch nicht bei Verwendung von Tris an Stelle von MOPS als Puffersubstanz im Polymerasetest. 30 μ M p-Hydroxymercuriphenylsulfonat hemmen die Aktivität fast vollständig (s. Abb. 20).

Tab. 7: Wirkung von Inhibitoren

Für den Test mit Thiol-Reagenzien wurde die β -Mercaptoäthanol-Konzentration durch Dialyse gegen β -Mercaptoäthanolfreien Puffer 2 auf 3 μ M reduziert. Das Enzym wurde mit p-Hydroxymercuriphenylsulfonat bei 4°C für 30 min vorinkubiert. Für den Test mit N-Äthylmaleinimid wurde eine frische Lösung in absolutem Äthanol hergestellt und diese mit Wasser auf 20% (V/V) gebracht. Die Endkonzentration im Test war 4%, was keinerlei Einfluß auf die Enzymaktivität ausübte. Bei 4°C wurde für 30 min mit N-Äthylmaleinimid vorinkubiert. Mit anderen Inhibitoren wurde keine Vorinkubation ausgeführt. Die Konzentration von [3 H] dTTP war 15 μ M.

Agens	Konzentration	Aktivität
	mM	%
p-Hydroxymercuriphenylsulfonat	0,005	45
	0,05	5
N-Äthylmaleinimid	1	40
	10	15
Kaliumphosphat pH 7,5	25	87
	50	76
Natriumchlorid	30	130
	120	80
Pyridoxal-5'-phosphat	0,2	20
Pyridoxal $\cdot$ HCl	1	88
Pyridoxamin-5'-phosphat	1	103
Pyridoxol $\cdot$ HCl	1	97
Novobiocin	1	50
	2	10
Ethidiumbromid	0,03	66
Heparin	0,5 μ g/ml	50

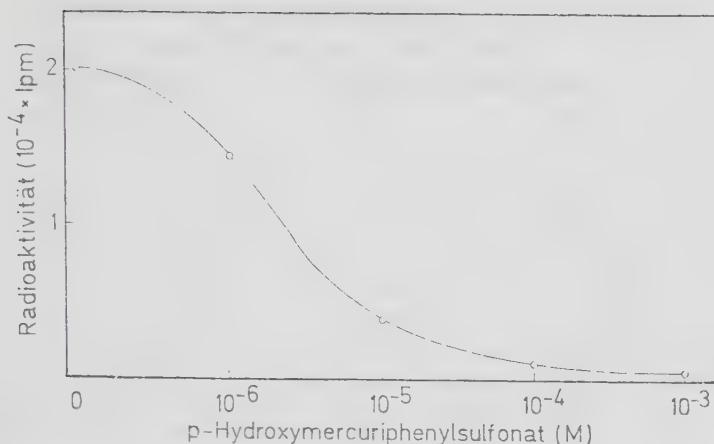


Abb. 20: Hemmung der DNA-Polymerase durch p-Hydroxymercuriphenylsulfonat. Die Angaben der Konzentration beziehen sich auf die Vorinkubation. Dazu wurden 20 μl p-Hydroxymercuriphenylsulfonat-Lösung und 70 μl Testansatz, der 20 μl Enzympräparation, aber keine aktivierte DNA enthielt, gemischt und 5 min bei 27°C vorinkubiert. Danach sind 10 μl DNA-Lösung zugegeben worden, um die Reaktion zu starten. Der β -Mercapto-Äthanol-Gehalt war durch Dialyse auf 5 μM reduziert worden.

Im Gegensatz zur DNA-Polymerase- α (11) wird Schritt-5 Enzym aus *Physarum* durch 30 mM Natriumchlorid stimuliert und erst durch Konzentrationen über 100 mM gehemmt (s. Abb. 21).

50 mM HPO_4^{--} hemmt die Polymeraseaktivität, was zusammen mit der Unfähigkeit, $\text{p(A) \cdot (dT)}_{12}$ als Starter-Matrize zu verwenden, ein Indiz dafür ist, daß es sich auch nicht um eine γ -Polymerase handelt (11).

Das Enzym war gegenüber Novobiocin sensitiv (s. Abb. 22). Bei *E. coli* wurde gefunden, daß der Angriffspunkt DNA-Gyrase ist, ein Enzym, das den "supercoil" der DNA aufhebt (87).

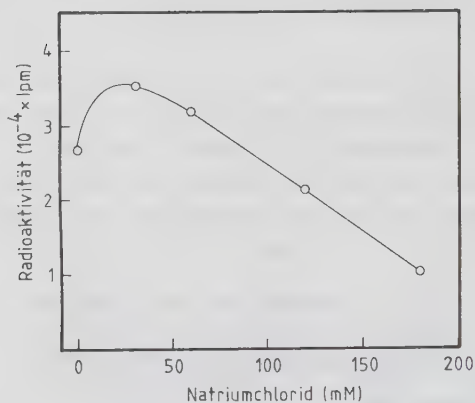


Abb. 21: Einfluß von Natriumchlorid auf die DNA-Polymeraseaktivität. Die Konzentration an Mg^{++} war 5 mM, an K^+ 45 mM.

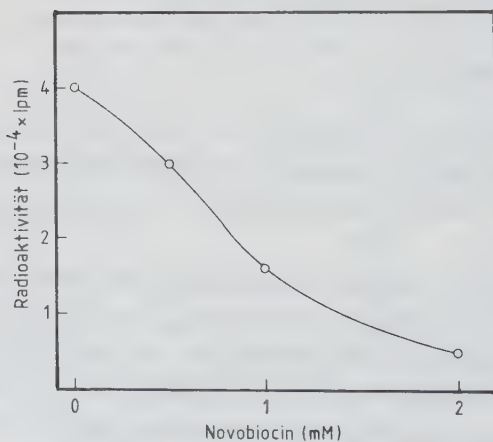


Abb. 22: Wirkung von Novobiocin auf die DNA-Polymeraseaktivität. Novobiocinlösung, Substratgemisch und Enzympräparation wurden nacheinander einpipettiert. K^+ war 140 mM, Mg^{++} 5 mM.

Ethidiumbromid, eine interkalierende Substanz, stimuliert in sehr kleinen Dosen ($2,5 \mu\text{M}$) die Aktivität, während $5 \mu\text{M}$ bereits zu einer Hemmung von 20% führen (s. Abb. 23).

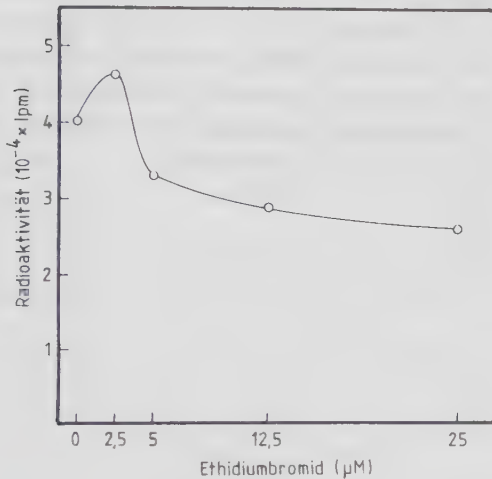


Abb. 23: Wirkung von Ethidiumbromid auf die DNA-Polymeraseaktivität. Die Lösung des Agens, $60 \mu\text{l}$ Substratmischung und $20 \mu\text{l}$ Enzympräparation wurden nacheinander einpipettiert; die K^+ -Konzentration war 140 mM , die von Mg^{++} 5 mM .

Heparin hemmt die Enzymaktivität, wie auch bei DNA-Polymerase- α beobachtet (88). Sulfatester von Polysacchariden und andere Polyanionen, die im Zellkern vorkommen, wirken auf α -Polymerase hemmend (89).

Je nach Enzympräparation schwankte die Empfindlichkeit erheblich. Auffällig war, daß bereits bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ maximale Hemmung erreicht wurde und eine Dosissteigerung keine weitere Hemmung mehr bewirkte (s. Abb. 24). Möglicherweise lagen in diesen Präparationen Gemische von heparin-hemmenden und nichthemm-

baren DNA-Polymerasemolekülen in verschiedenen Verhältnissen vor. Diese Annahme könnte die Empfindlichkeitsschwankungen erklären. Folgender Befund würde diese Hypothese unterstützen.

Da Heparin eine Affinität zu DNA-Polymerase besitzt, wurde versucht, diese Tatsache zur Reinigung auszunützen. Eine Chromatografie an Heparin-Sepharose 4B zeigte jedoch, daß etwa 30% der Aktivität nicht gebunden wurde und im Durchlauf erschien. Beim Durchlaufenzym handelte es sich möglicherweise um die durch Heparin nicht hemmbaren Polymerasemoleküle.

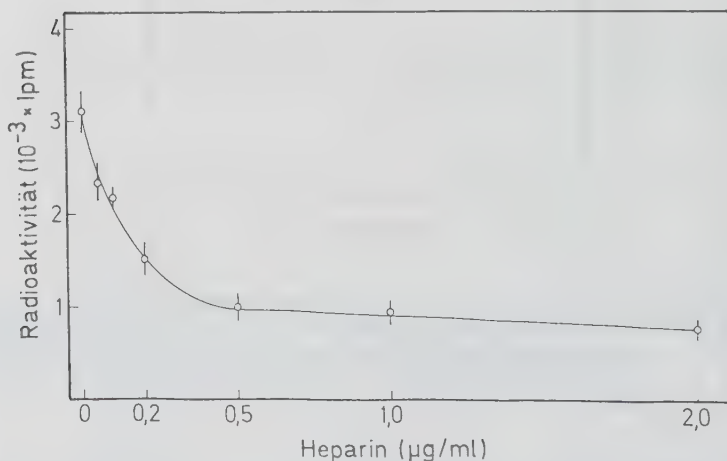


Abb. 24: Einfluß von Heparin auf die DNA -Polymeraseaktivität. Heparinlösung und Substratgemisch wurden zusammenpipettiert und zuletzt 20 µl Enzympräparation hinzugeben. Die K⁺- und Mg⁺⁺-Konzentrationen waren 140 mM bzw. 5 mM. Die Meßdaten sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Von verschiedenen Vitamin B6 Derivaten hemmt ausschließlich Pyridoxal-5'-phosphat die DNA-Polymerase. Wichtig für die Wirkung ist das Vorhandensein beider funktionel-

ler Gruppen, der Aldehydgruppe und des Phosphatrestes. Es wird angenommen, daß die Bildung einer Schiff'schen Base mit einem Lysin- oder Argininrest im oder in der Nähe des aktiven Zentrums für die Wirkung verantwortlich ist (90,86). Ferner scheint eine ionische Wechselwirkung des Enzyms mit der Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphates bzw. den Phosphatgruppen der Desoxynukleotide stattzufinden. Zugabe von Desoxynukleosid-5'-triphosphaten bis zu einer Konzentration von 1 mM konnte die Wirkung von 0,2 mM Pyridoxal-5'-phosphat auch nicht partiell aufheben. Eine kompetitive Hemmung der DNA-Polymerase durch Pyridoxal-5'-phosphat, von der in der Literatur berichtet wurde (90,86), konnte nicht gefunden werden.

5.5.9. Unterschiedliche Wirkung von Spermidin

Wie in Abb. 25 dargestellt, unterscheidet sich Schritt-3 Enzym von Schritt-1 oder -2 Enzym in seiner Reaktion auf Spermidin. Im Gegensatz zu einer bis zu 15-fachen Stimulierung von Schritt-1 Enzym ist das Enzym nach DEAE-Sephadex nur noch 1-2-fach durch Spermidin stimulierbar. Ebenso zeigt Schritt-5 Enzym eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Spermidin. Man kann annehmen, daß der Anionenaustauscher eine Komponente aus der Präparation entfernt, die für die hohe Spermidinsensitivität verantwortlich ist.

In einem weiteren Versuch wurden die Fraktionen einer Sepharose CL6B Säule je einmal mit 0 mM und 5 mM Spermidin im Ansatz getestet. Das Ergebnis ist in Abb. 26 dargestellt. Die maximale Stimulierbarkeit fällt nicht mit den Maxima der DNA-Polymeraseaktivität mit und ohne Spermidin zusammen. Daraus läßt sich schließen, daß es einen von der Polymerase abtrennbaren Faktor gibt, der die Stimulierung vermittelt und der nicht zusammen mit ihr, sondern etwas vor dem Maximum eluiert. Weitere Untersuchungen müssen erst zeigen, ob es sich dabei um Nukleinsäure oder einen Proteinfaktor handelt (91).

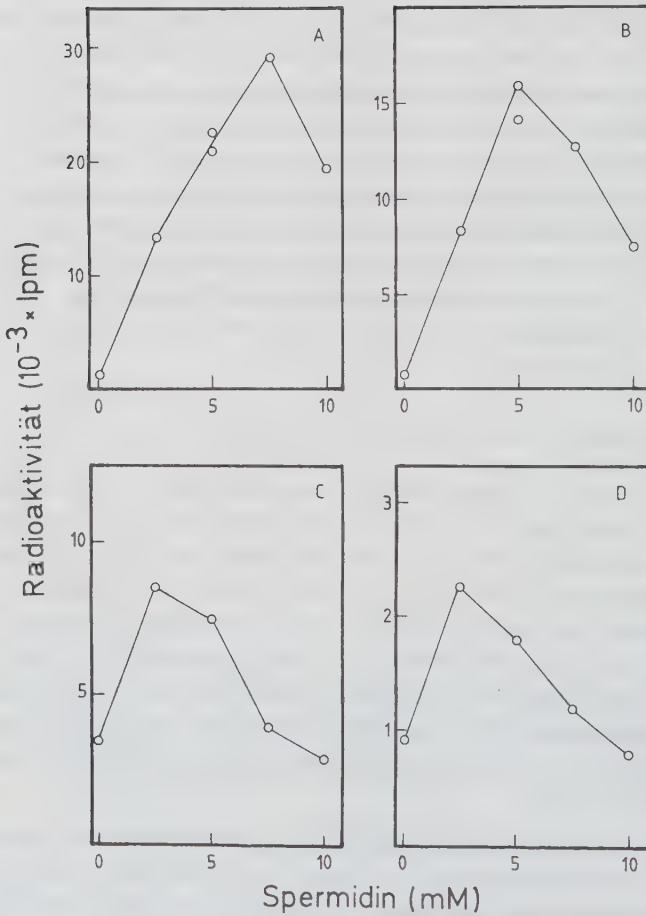


Abb. 25: Wirkung von Spermidin auf den Einbau von [^3H] dTMP. Enzympräparationen von Schritt 1 bis 3 wurden im Standardansatz mit steigenden Mengen Spermidin getestet. A) Schritt-1 Enzym ($0,7 \cdot 10^{-3}$ Einheiten/Ansatz); B) Schritt-2 Enzym ($0,3 \cdot 10^{-3}$ Einheiten/Ansatz); C) Schritt-3 Enzym ($2,1 \cdot 10^{-3}$ Einheiten/Ansatz); D) Schritt-3 Enzym ($0,5 \cdot 10^{-3}$ Einheiten/Ansatz).

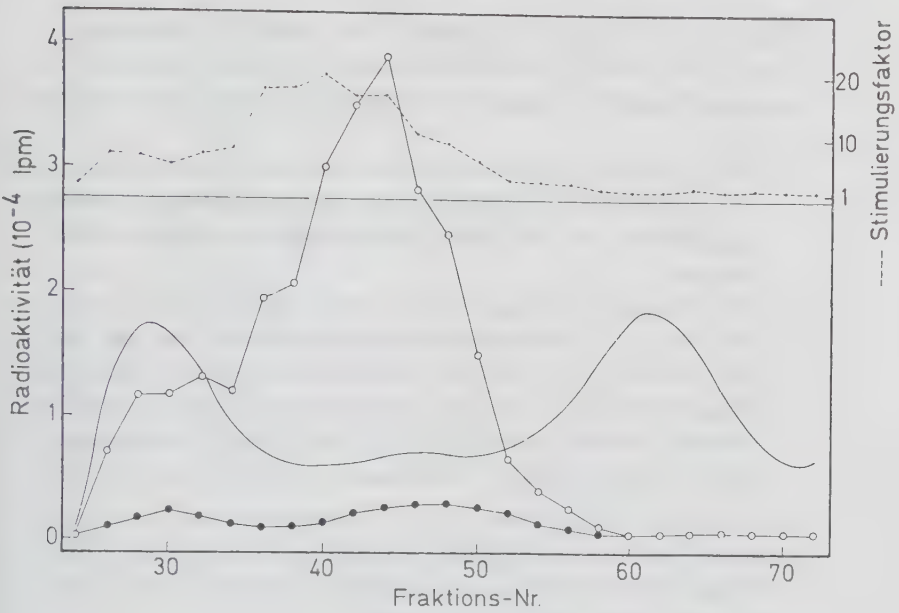


Abb. 26: Stimulierbarkeit der Fraktionen einer Sepharose CL 6B Säule durch Spermidin. 80 ml von eingengtem Schritt-1 Enzym wurden aufgetragen und jede zweite Fraktion je einmal mit 0 mM und 5 mM Spermidin im Ansatz getestet.

(●—●) 0 mM Spermidin im Ansatz;
(○—○) 5 mM Spermidin im Ansatz;
(— — —) Absorption bei 280 nm.

3.4. Anreicherung von DNA-Polymerase im präparativen Maßstab

Das für die Charakterisierung von partiell gereinigtem Enzym verwendete Anreicherungsverfahren war für eine weitergehende Reinigung aus folgenden Gründen nicht geeignet:

- a) Die Menge an Schritt-5 Enzym war nicht ausreichend für weitere Reinigungsstufen. Das bedeutete, die Ausgangsmenge von 150-200 g Frischgewicht mußte erhöht werden.
- b) Für größere Ausgangsmengen waren der erste und zweite Schritt, die hochtourige Zentrifugation und die Sepharose 6B Säule völlig ungeeignet. Als Ersatz mußte eine schnelle, auch für große Mengen leicht zu handhabende Methode verwendet werden. Diese Bedingungen würde ein geeigneter Fällungsschritt erfüllen.

Das Problem der Erhöhung des Frischgewichtes ließ sich dadurch lösen, daß größere Ansätze mit bis zu 40 l Medium gezüchtet wurden. Die Methode ist in Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

Als Ersatz für den ersten und zweiten Schritt wurden verschiedene Fällungsmethoden versucht, z.B. Ammoniumsulfat, PEG 6000, Dextran T 70, Polymin P. Nach verschiedenen Vorversuchen erwiesen sich Ammoniumsulfat und Polymin P als geeignet. Es wurden zwei präparative Aufarbeitungen durchgeführt, einmal mit einer 25-50% Ammoniumsulfatfällung und einmal mit einer 0,3% Polymin P Fällung als erstem Schritt.

3.4.1. Anreicherung mit Ammoniumsulfat-Fällung als erstem Schritt

3.4.1.1. Homogenat und Ammoniumsulfat-Fällung

Eine Übersicht ist in Tabelle 8 dargestellt.

Die Mikroplasmodien wurden durch ein Säckchen aus Baumwolle (20 x 40 cm) vom Medium abfiltriert und in einem 10 l Eimer mit entmineralisiertem Wasser unter Zusatz

Tab. 8:

Anreicherung von DNA-Polymerase mit Ammoniumsulfat-Fällung als erstem Schritt. Die Angaben gelten für den Zustand einer Enzympräparation, wie sie für den nächsten Schritt verwendet wurde. Die Werte sind auf 100 g-Frischgewicht bezogen. Eine Enzym-einheit ist definiert als der Einbau von 1 nMol [^3H] dTTP/50 min. Im Standardtest mit 15 μM dTTP (Inkubationstemperatur 27°C).

Schritt	Fraktion	Volumen ml	Protein mg	Aktivität Einheiten	spezifische Aktivität Einheiten/mg	Anreiche- rungs-faktor	Ausbeute %
1	Homogenat	500	1770	107	0,06	1	100
2	Ammoniumsulfat-Fällung	104	545	200	0,37	6	153
3	DEAE-Cellulose	10,9	44	14	0,53	5,5	13
4	DNA-Cellulose	17,3	0,554	14	25,3	420	13
5	Phospho-Cellulose	3,8	0,312	3,9	12,4	206	3,6
6	DEAE-Sephadex A25	0,45	0,022 ¹⁾	2,9	133	2200	2,7
7	Nicht-denaturierende Elektrophorese		0,003 ²⁾	2,7	890	15000	

1) Protein nach Kalckar bestimmt

2) Protein densitometrisch bestimmt

von 1 g PMSF gewaschen. Durch das Säckchen wurde erneut abfiltriert und das Gewicht des Rückstandes nach dem Abtropfen der Flüssigkeit als Frischgewicht (5,5 kg) genommen. Alle weiteren Schritte wurden bei 0-4°C ausgeführt. Zu den Mikroplasmadien wurde Puffer 1 im Verhältnis 1 + 4 gegeben, sowie 2 g PMSF und als Antischaummittel 3,5 mM Octanol zugesetzt. Im Braun-Mixer wurde 30 s bei Stufe I homogenisiert und danach das Homogenat zu 25% mit Ammoniumsulfat durch Zugabe der gemahlenden Substanz gesättigt. In einer Stock-Zentrifuge wurde bei 3000 Upm (4000 x g) eine Stunde lang zentrifugiert, der Überstand zu 50% mit Ammoniumsulfat gesättigt und in einer WKF-Zentrifuge eine Stunde bei 8000 Upm (10 000 x g) zentrifugiert. In wenig Puffer 2 wurde der Niederschlag suspendiert und zweimal gegen 5-10 l desselben Puffers dialysiert. Nach der Dialyse wurde der suspendierte Niederschlag in einem dem Frischgewicht entsprechenden Volumen Puffer 2 gelöst und durch einstündige Zentrifugation bei 8000 Upm in einer WKF-Zentrifuge vom Ungelösten getrennt. Die Anreicherung gegenüber dem Homogenat war etwa 6-fach.

3.4.1.2. DEAE-Cellulose Batch

Die visköse Beschaffenheit des gelösten Ammoniumsulfat-Niederschlags machte einen Säulenlauf über DEAE-Cellulose unmöglich. Die Poren der Säulenoberfläche verstopften rasch und verhinderten somit eine akzeptable Durchflußgeschwindigkeit. Daher wurden 5 l gequollene DEAE-Cellulose SS (Serva), entsprechend etwa 1 ml/g Frischgewicht, mit der Enzympräparation vermischt und durch 15 min langes Rühren äquilibriert. In der Stock-Zentrifuge wurde bei 1000 Upm (8 min) die Cellulose sedimentiert und der Überstand abgossen. Mit 4,5 l Puffer 2 wurde dreimal gewaschen und danach zweimal mit 4,7 l 0,2 M Kaliumchlorid in Puffer 2 eluiert. Die vereinigten Eluate wurden mit Ammoniumsulfat zu 70% gesättigt und der Nieder-

schlag durch einstündige Zentrifugation bei 8000 Upm in einer WKF-Zentrifuge abgetrennt. Der Niederschlag wurde in Puffer 2 gelöst, gegen 5 l desselben dialysiert und durch 30 min lange Zentrifugation bei 3500 Upm in der IEC-Zentrifuge das Ungelöste entfernt. Die Fraktion wurde auf eine DNA-Cellulose Säule aufgetragen. Die Ausbeute aus dem gesamten DEAE-Cellulose Batch war 45%. Davon waren 60% im Eluat. Leider verminderte die Ammoniumsulfat-Fällung die Gesamtaktivität drastisch. Sie sank auf 30% der Aktivität des Eluats vor der Fällung.

.4.1.3. DNA-Cellulose Chromatografie

Auf die sukzessive mit 0,4 M Kaliumchlorid in Puffer 2 und Puffer 2 gewaschene Säule mit einem Volumen von 320 ml (7 x 8,5 cm; 0,06 ml/g Frischgewicht) wurden 600 ml Enzympräparation, entsprechend 2,4 g Protein bzw. 770 Einheiten, aufgetragen. Mit Puffer 2 wurde bis zum Absinken der Absorption bei 280 nm auf die Basislinie gewaschen und mit einem linearen Gradienten aus 1000 ml Puffer 2 und 1000 ml 0,4 M Kaliumchlorid in Puffer 2 eluiert. In Fraktionen von 30 ml wurde das Eluat aufgefangen. Die zwischen einer Leitfähigkeit von 15 mS/cm und 26,5 mS/cm mit einem Maximum bei 19,4 mS/cm eluierten Anteile wurden gepoolt und gegen Puffer 2 dialysiert. Die Ausbeute war quantitativ.

.4.1.4. Phospho-Cellulose Chromatografie

Der Pool aus der DNA-Cellulose (30,5 mg Protein, 770 Einheiten) wurde auf eine 80 ml Phospho-Cellulose Säule (4 x 6,5 cm) aufgetragen, die Säule mit Puffer 2 gewaschen und mit einem linearen Gradienten, bestehend aus 250 ml Puffer 2 und 250 ml 0,6 M Kaliumchlorid in Puffer 2 eluiert. In Fraktionen von 14 ml wurde das Eluat gesammelt. Die zwischen der Leitfähigkeit von 6,3 mS/cm und 21,5 mS/cm eluierenden Anteile wurden gepoolt und gegen Puffer 2 dialysiert. Die Gesamtausbeute der Säule war 55%, der Pool enthielt 65% davon.

3.4.1.5. DEAE-Sephadex A25 Chromatografie

Die Enzympräparation aus der Phospho-Cellulose Säule wurde auf eine DEAE-Sephadex A25 Säule (3 x 5 cm) aufgetragen (17,2 mg Protein, 220 Einheiten). Nach dem Waschen der Säule wurde mit einem linearen Gradienten, bestehend aus 100 ml Puffer 2 und 100 ml 0,2 M Kaliumchlorid in Puffer 2, eluiert und Fraktionen von 12 ml gesammelt. Die zwischen einer Leitfähigkeit von 8,3 und 15 mS/cm mit einem Maximum bei 9 mS/cm eluierenden Anteile wurden gepoolt und nach entsprechender Dialyse für nicht-denaturierende Elektrophorese, isoelektrische Fokussierung, Gelfiltration und Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Die Ausbeute war quantitativ.

3.4.1.6. Nicht-denaturierende Elektrophorese

Sie wurde wie unter Material und Methoden beschrieben ausgeführt. Aufgetragen wurden 400 µl des Enzyms aus der DEAE-Sephadex A25 Säule ($\hat{=}$ 20 µg Protein, 1,8 Einheiten). Nach der Elution durch Diffusion über Nacht wurden 1,5 Einheiten wiedergefunden; nach weiteren 4 Tagen des Eluierens wurde praktisch quantitative Ausbeute erhalten.

Ein parallel nach Weber und Osborn mit Coomassie Brilliantblau angefärbtes Gel wurde mit einem Helium-Neon-Laser (633 nm) densitometrisch vermessen. Die gefärbten Banden wurden integriert (s. Abb. 27). Die Proteinmenge in der aktiven Bande berechnete sich zu 3 µg. Das bedeutet eine Anreicherung gegenüber dem Auftragsmaterial von 6,7-fach. Der Reinigungsfaktor in der Anreicherungstabelle (s. Tab. 8) für die aktive Bande in der Elektrophorese erhöht sich damit auf 14 700.

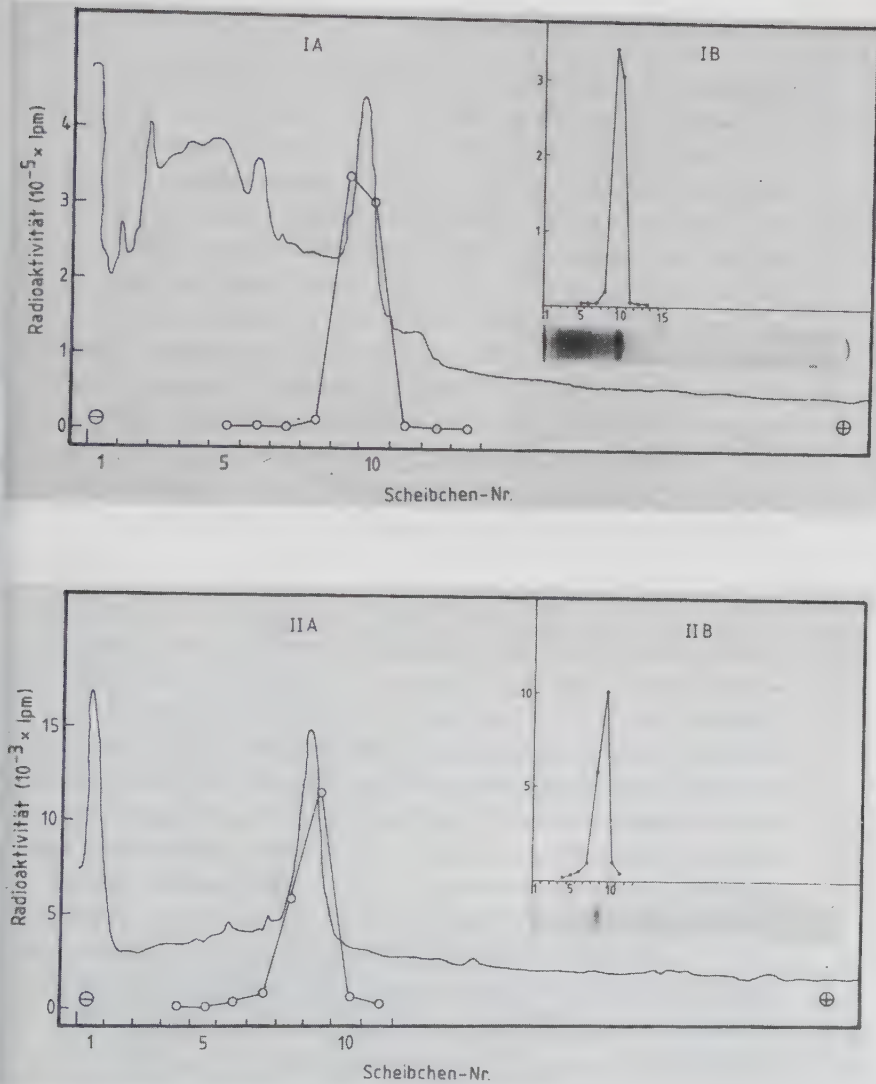


Abb. 27: I) Nicht-denaturierende Elektrophorese einer Enzympräparation aus DEAE-Sephadex A25. a) Densitometrische Aufschreibung und Aktivitätsverteilung; b) Angefärbtes Gel und Verteilung der Enzymaktivität.
 II) Relektrophorese des aktiven Scheibchens aus I.
 a) Densitogramm und Aktivitätsverteilung; b) Gefärbtes Gel und Aktivitätsverteilung.

3.4.1.7. Isoelektrische Fokussierung

Abgesehen vom pH-Bereich wurde sie ausgeführt, wie unter Material und Methoden beschrieben. Dieser erstreckte sich von pH 4-6. Die Ampholine von pH 4-6 und pH 5-7 waren zu gleichen Teilen in einer Konzentration von insgesamt 2% im Gel enthalten. Aufgetragen wurden 200 µl des Enzyms aus der DEAE-Sephadex A25 Säule (10 µg Protein, 0,9 Einheiten). Zwei Gele wurden in 2,1 mm Sektionen geschnitten, eines davon mit 1 ml destilliertem Wasser für die pH-Wert-Bestimmung eluiert, das andere zum Test auf DNA-Polymerase verwendet. Die Ausbeute war 60%. Ein weiteres Gel wurde nach Vestberg gefärbt. Die Enzymaktivität konnte mit einer anfärbbaren Bande korreliert werden. Der isoelektrische Punkt wurde zu $5,3 \pm 0,1$ bestimmt (s. Abb. 28).

3.4.1.8. Analytische Gelfiltration

Enzympräparationen aus Schritt 3 und 6 wurden einer analytischen Gelfiltration über Ultrogel AcA₃₄, äquilibriumiert mit 0,4 M Kaliumchlorid, 1,6 M Harnstoff in Puffer 2, unterworfen. In beiden Fällen ergab sich ein einziger Gipfel mit Enzymaktivität, der ein scheinbares Molekulargewicht von 75 000 hatte, entsprechend einem Stokeschen Radius von 3,70 nm (s. Abb. 29). Enzym aus Schritt 6 wurde gleichzeitig auf eine Ultrogel AcA₃₄ Säule, äquilibriumiert mit 0,4 M Kaliumchlorid in Puffer 2 gegeben. Die Aktivität eluierte ebenfalls in einem einzigen Gipfel entsprechend einem scheinbaren Molekulargewicht von 75 000 und einem Stokeschen Radius von 3,70 nm.

3.4.1.9. Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation

Enzympräparation aus DEAE-Sephadex A25 wurde gegen 0,4 M Kaliumchlorid in Puffer 2 ohne Glycerin und 0,4 M Kaliumchlorid, 1,6 M Harnstoff in Puffer 2 ohne Glycerin

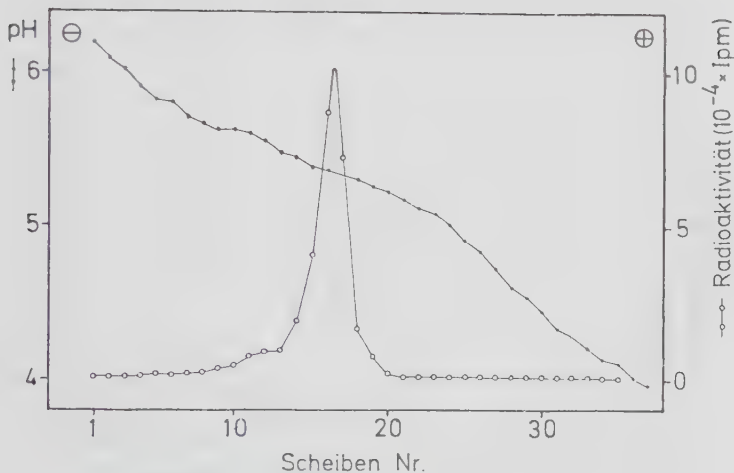


Abb. 28: Isoelektrische Fokussierung einer Enzympräparation aus DEAE-Sephadex A25. Aus zwei Versuchen ergab sich ein isoelektrischer Punkt von 5,4 bzw. 5,5.

dialysiert und 200 μ l je Gradient aufgetragen. Wie Abb. 30 zeigt, ändert die An- oder Abwesenheit von Harnstoff nichts an der Sedimentationskonstanten von DNA-Polymerase. Sie erscheint in einem einzigen Gipfel bei $5,0 \pm 0,1$ S.

Setzt man den erhaltenen Stoke'schen Radius und die Sedimentationskonstante in die Formel (1) (s. Abschnitt 3.2. Physikalische Parameter der DNA-Polymerase) ein, so errechnet sich ein Molekulargewicht von $M_r = 78\,000$ (Form D). Entsprechend der Formel (2) erhält man für den Reibungsquotienten einen Wert von 1,31. Im Gegensatz zu den Formen A, B und C (s. Tab. 4) zeigen die Werte, daß diese Form der DNA-Polymerase sich wie ein globuläres Protein verhält.

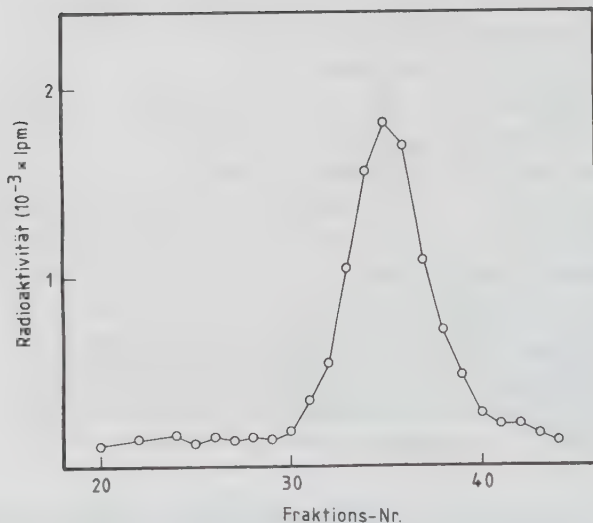


Abb. 29: Analytische Gelfiltration von Enzym aus DEAE-Sephadex A25 über Ultrogel AcA34 äquilibriert mit 0,4 M Kaliumchlorid, 1,6 M Harnstoff in Puffer 2. 1,3 Einheiten wurden aufgetragen, die Ausbeute war quantitativ. Das scheinbare Molekulargewicht betrug 75 000.

3.4.1.10. Diskussion

Es bleibt noch die Frage zu klären, warum bei dieser Aufarbeitung ausschließlich die globuläre Form D mit dem Molekulargewicht 78 000 aufgetreten ist. Wie Gelfiltrationen und Dichtegradientenzentrifugationen gezeigt haben, war die Anwesenheit von Harnstoff dafür nicht verantwortlich. Andere Versuche ergaben, daß bereits im 50% Ammoniumsulfat-Niederschlag (Schritt 2) die Form D ausschließlich vorkam. Dies könnte dafür sprechen, daß die Einwirkung von Ammoniumsulfat für

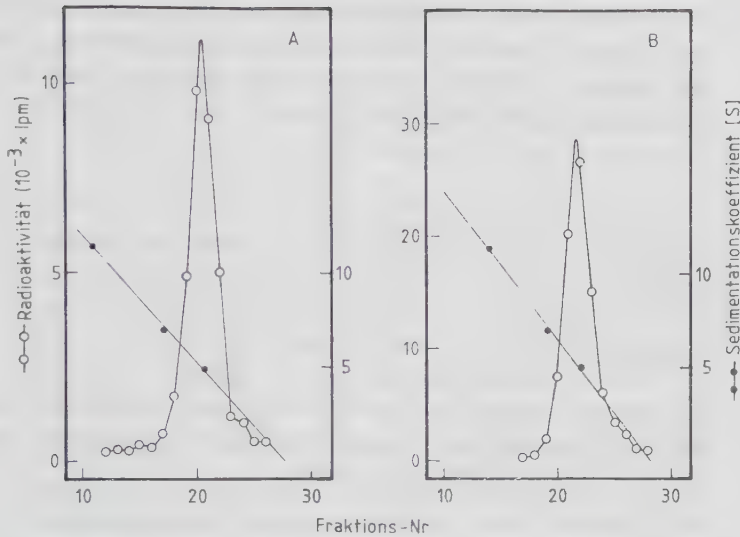


Abb. 30: 10-30% Glycerin-Dichtegradienten-Zentrifugation von Enzym aus DEAE-Sephadex A25 bei Anwesenheit von 0,4 M Kaliumchlorid (A) und 0,4 M Kaliumchlorid, 1,5 M Harnstoff (B). Als Marker wurden Katalase (11,3 S), Laktat-Dehydrogenase (6,9 S) und Alkohol-Dehydrogenase (4,9 S) verwendet. Aufgetragen wurden 0,9 Einheiten ($\approx 10 \mu\text{g}$ Protein). Als Sedimentationskonstanten ergaben sich im Falle von A 4,9 S und von B 5,0 S.

die Entstehung dieser Form verantwortlich war. Einige Aufarbeitungen zeigten jedoch, daß dies nicht der Fall war. Auch nach Anwendung von Ammoniumsulfat konnten die Formen A und B in der Gelfiltration bzw. im Dichtegradienten gefunden werden. Jüngste Versuche haben den Verdacht erhärtet, daß Kulturbedingungen, insbesondere das Alter der Kultur, für das Auftreten der verschiedenen Formen verantwortlich sein könnten. Je nachdem in welcher Wachstumsphase, ob exponentiell oder bereits im Übergang zur stationären Phase, werden die einzelnen Formen in unterschiedlicher Menge gefunden. Während des

exponentiellen Wachstums (bis zwei Tage nach Inokulation) findet man ausschließlich die Form A. Nachdem A die größte Form ist, könnte man sich vorstellen, daß die anderen entweder durch proteolytischen Abbau von A entstehen oder daß verschiedene Faktoren dem DNA-Polymerasekomplex verlorengehen.

3.4.2. Präparative Anreicherung mit Polymin P Fällung als erstem Schritt

3.4.2.1. Homogenat und Polymin P Fällung

Von diesem Versuch ab wurde die Inkubationstemperatur auf 37°C erhöht, um höheren Einbau von [³H] dTMP zu erhalten (s. Abschnitt 3.3.2.).

Die Aufarbeitung ist, mit Ausnahme der nachfolgend angegebenen Änderungen, prinzipiell gleich der zuvor beschriebenen.

Die Mikroplasmadien (4 kg) wurden nicht mit Puffer 1, sondern mit 10 mM EDTA pH 7,0 homogenisiert, um auch die Kerne zu lysieren (51). Nach dem Homogenisieren wurde langsam 1/2 - 1 Stunde gerührt, um vollständige Lyse zu erreichen. Eine Lösung von 10% Polymin P wurde bis zu einer Konzentration von 0,3% im Lysat zugegeben. Die besten Ausbeuten wurden erreicht, wenn die Polymin P Stammlösung einen pH von 9-10 hatte. Es entstand ein flockiger, durch 15 min lange Zentrifugation bei 3000 Upm in der Stock-Zentrifuge leicht abzutrennender Niederschlag, der praktisch die gesamte DNA enthielt. Die Enzymaktivität blieb im Überstand. Dieser wurde zu 70% mit Ammonsulfat gesättigt und der Niederschlag 20 min bei 3000 Upm in der Stock-Zentrifuge abzentrifugiert.

Man suspendierte ihn in wenig Puffer 3 und dialysierte zweimal gegen 5-10 l desselben Puffers. Nach der Dialyse wurde der suspendierte Niederschlag in einem dem

Frischgewicht entsprechenden Volumen Puffer 3 gelöst und durch 30 min lange Zentrifugation bei 3000 Upm in der IEC-Zentrifuge vom Ungelösten getrennt. In allen Anreicherungsschritten wurde Puffer 3 verwendet.

3.4.2.2. Chromatografie an DEAE-Sephacel

Der gelöste und dialysierte Ammoniumsulfat-Niederschlag wurde auf eine 10 x 19 cm (1500 ml) DEAE-Sephacel Säule aufgetragen, diese mit 1700 ml Puffer 3 gewaschen und mit 3000 ml 0,2 M Kaliumchlorid in Puffer 3 eluiert. Das Eluat wurde gegen Puffer 3 dialysiert, bis die Leitfähigkeit etwa 3 mS/cm betrug und auf DNA-Cellulose aufgetragen. Alle weiteren Schritte sind wie unter 3.4.1. beschrieben, ausgeführt worden.

Eine Zusammenfassung der Anreicherung ist in Tab. 9 dargestellt.

3.4.2.3. Nicht-denaturierende Elektrophorese

Es wurde die Enzympräparation dieser Aufarbeitung mit der unter 3.4.1 beschriebenen verglichen. Wie Abb. 31 zeigt, enthielten beide Präparationen die schnell wandernde Form D mit dem Molekulargewicht 78 000. In der Anreicherung mit Polymin P Fällung waren jedoch zusätzliche Formen enthalten, die nur $1/3 - 1/2$ so tief wie Form D in das Gel liefen.

Die schnell wandernde Form D war in der frischen Enzympräparation von Schritt 6 nicht enthalten. Sie trat erst nach vierwöchiger Lagerung des Enzyms bei $2-4^{\circ}\text{C}$ auf. Das langsame Erscheinen der kleinen Form D könnte auf die Wirkung von Proteasen zurückzuführen sein, eine Dissoziation des hochmolekularen Enzymkomplexes ist allerdings auch nicht auszuschließen.

Tab. 9:

Anreicherungsstabelle der Aufarbeitung mit Polymin P Fällung als erstem Schritt. Die Werte sind für den Zustand einer Enzympräparation angegeben, wie er für den nächsten Schritt verwendet wurde und beziehen sich auf 100 g Frischgewicht. Eine Enzymeinheit ist definiert als der Einbau von 1 nMol [^3H] dTMP/30 min im Standardtest mit 15 μM dTTP. Die Inkubationstemperatur war 37°C.

Schritt	Fraktion	Volumen	Protein	Aktivität	spezifische Aktivität	Anreicherungs-faktor
		ml	mg	Einheiten	Einheiten/mg	-fach
1	Homogenat	725	1680	92	0,055	1
2	Polymin P Fällung	100	516	540	1,04	19
3	DEAE-Sephacel	30,4	187	482	2,56	47
4	DNA-Cellulose	20,0	4,70	342	72,8	1330
5	Phospho-Cellulose	6,6	1,31	178	137,0	2500
6	DEAE-Sephadex A25	4,75	0,57	120	210,0	3800

3.4.2.4. Isoelektrische Fokussierung

Die Enzympräparationen aus DEAE-Sephadex A25 von beiden Aufarbeitungen wurden verglichen. Wie Abb. 32 zeigt, ist in beiden die Form D mit dem isoelektrischen Punkt von 5,5 vorhanden. Die höhermolekularen Formen haben isoelektrische Punkte zwischen 6,5 und 7,5.

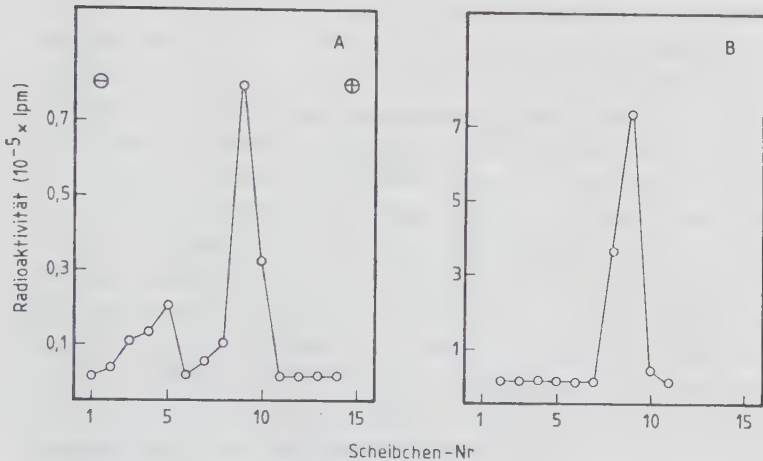


Abb. 31: Nicht-denaturierende Elektrophorese von Enzympräparationen aus DEAE-Sephadex A25:

A) aus der Aufarbeitung mit Polymin P Fällung; 400 µl ($\approx$ 50 µg Protein, 29 Einheiten) wurden aufgetragen. Die Ausbeute war 30%.

B) aus der Aufarbeitung mit Ammoniumsulfat-Fällung; 400 µl ($\approx$ 20 µg Protein, 43 Einheiten) wurden aufgetragen. Die Ausbeute war quantitativ.

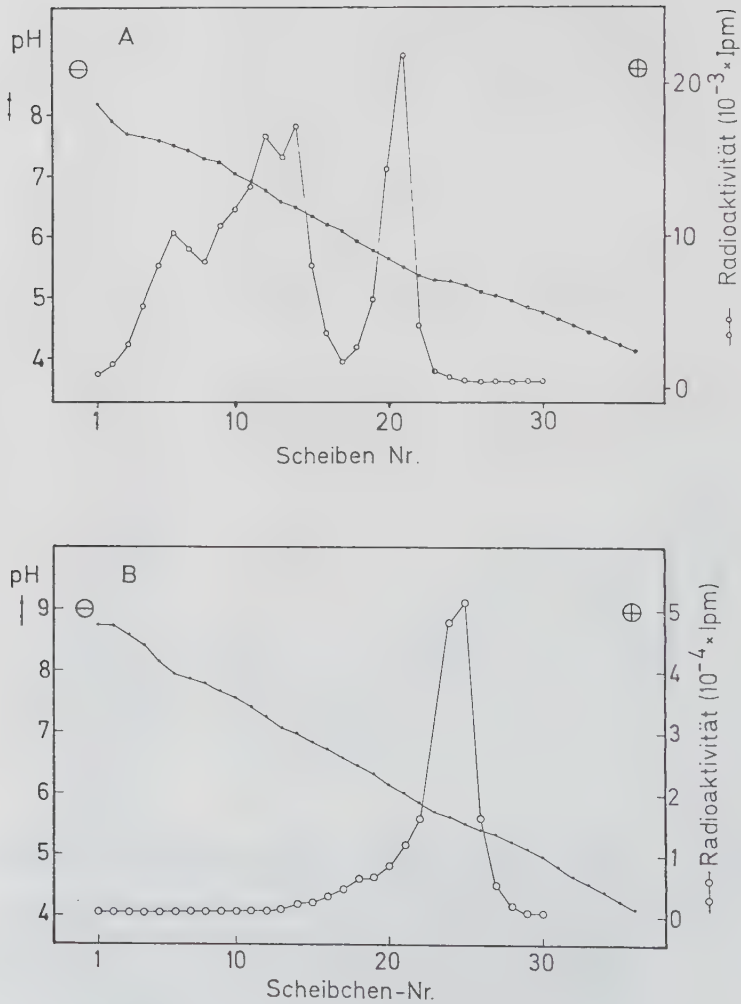


Abb. 32: Isoelektrische Fokussierung von Enzympräparationen aus DEAE-Sephadex A25.
 A) aus der Aufarbeitung mit Polymin P Fällung; 100 μl Probe wurden aufgetragen ($\approx 12 \mu\text{g}$ Protein, 2,5 Einheiten).
 B) aus der Aufarbeitung mit Ammoniumsulfat-Fällung; 100 μl Probe wurden aufgetragen ($\approx 5 \mu\text{g}$ Protein, 0,9 Einheiten).

3.4.2.5. Präparative nicht-denaturierende Elektrophorese

Sie wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, ausgeführt. Abb. 33 zeigt die Aktivitätsverteilung zweier Elektrophoresen. Es ist unklar, warum in einer der beiden die schneller wandernde Bande nicht auftrat. Der Auftrag auf dieses Gel war jedoch dreimal so stark eingeengt wie der auf das Gel mit der schneller laufenden Bande. Es wäre denkbar, daß die Proteinkonzentration einen Einfluß ausübt.

Um diese Methode zur Anreicherung des Enzyms verwenden zu können, sollte die Aktivität aus dem Gel mit guter Ausbeute eluiert werden. Ein elektrophoretisches Verfahren zeigte keine brauchbaren Resultate. Daher wurde ein den Scheibchen mit maximaler Enzymaktivität entsprechender Gelstreifen mit einem Skalpell aus dem gefrorenen Flachgel ausgeschnitten und zusammen mit demselben Volumen 0,2 M KCl in Puffer 2 mit 1 mg Rinderserumalbumin/ml in ein 15 ml Pottergefäß gegeben. Mit dem Dounce-Homogenisator wurde bei 1000 Upm durch mehrmaliges Auf- und Abbewegen das Gel zerkleinert. Nach 2 Stunden Stehenlassen wurde 1 Stunde bei 3500 Upm in einer IEC Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, der Niederschlag noch einmal mit derselben Menge Puffer resuspendiert und nach 2 Stunden zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden zum Test auf DNA-Polymeraseaktivität verwendet. Für die Proteinbestimmung wurde mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 eluiert.

Die Ausbeute betrug 30%, die spezifische Aktivität gegenüber dem Aufgetragenen erhöhte sich um das 1,6-fache.

3.4.2.6. SDS-Elektrophorese

Nicht-denaturierende und SDS-Elektrophorese wurden kombiniert, um einen Aufschluß über Größe und Zahl der Polypeptidketten zu erhalten. Abb. 35 zeigt, daß die maximale Enzymaktivität enthaltende Gelscheibe 7 der nicht-denaturierenden Elektrophorese 10 Polypeptidketten mit Molmassen

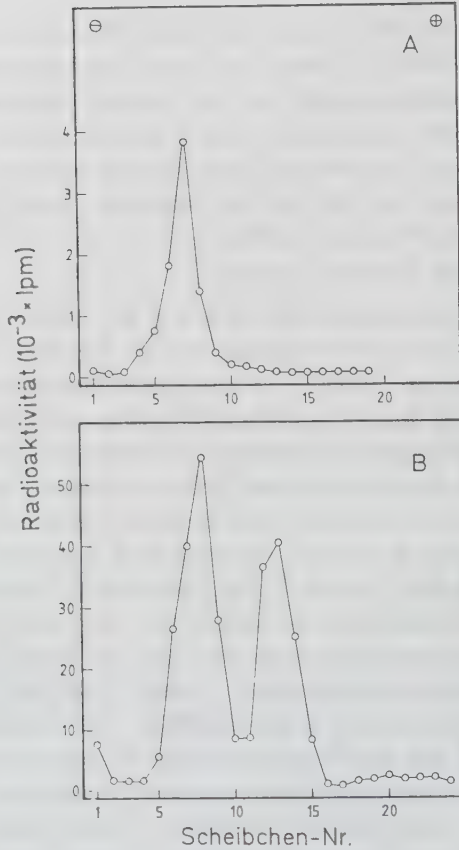


Abb. 33: Präparative nicht-denaturierende Elektrophorese.

A) 5 ml der auf 1/20 gegen PEG eingengten und gegen Probenpuffer dialysierten Enzympräparation aus DEAE-Sephadex A25 wurden auf ein präparatives Gel aufgetragen (11,5 mg Protein, 2250 Einheiten).
B) 5,2 ml einer auf 1/7 gegen PEG eingengten und gegen Probenpuffer dialysierten Enzympräparation aus DEAE-Sephadex A25 wurden aufgetragen (4,5 mg Protein, 970 Einheiten).

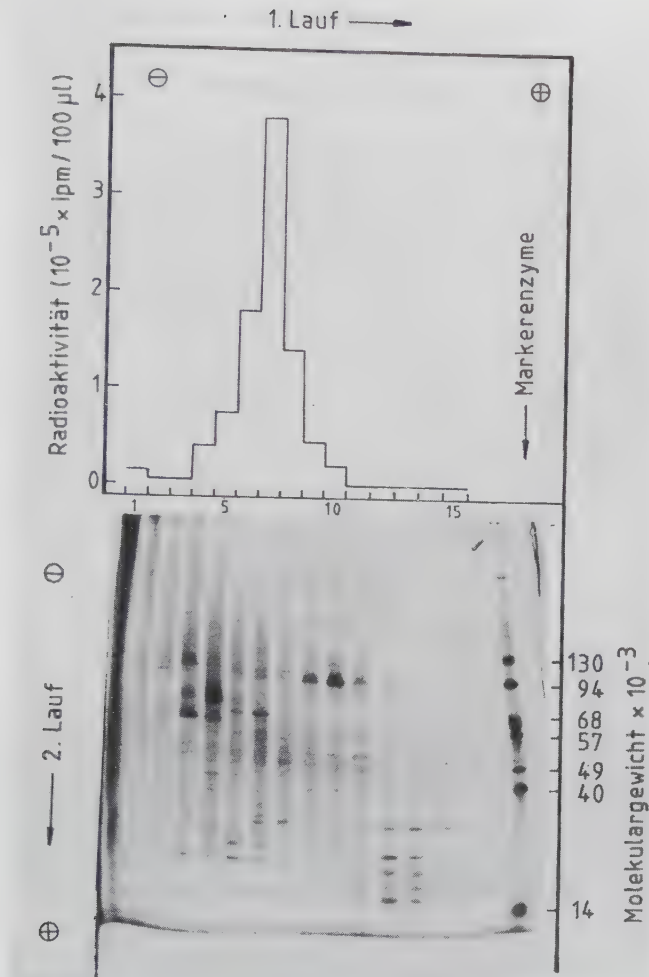


Abb. 34: SDS-Elektrophorese der Gelscheibchen 1-15 aus dem präparativen Gel in Abb. 33A. Die Gelscheibchen ($0,6 \times 0,3 \times 0,21 \text{ cm}$) wurden direkt auf ein $0,1\%$ SDS enthaltendes exponentielles Polyacrylamid-Gradientengel ($5\text{-}20\%$) aufgetragen.

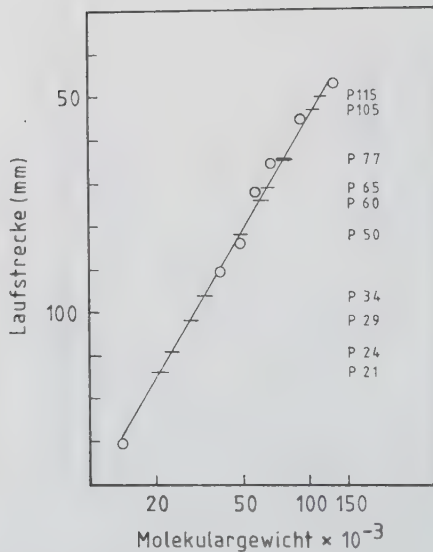


Abb. 35: Molmassen der aus Gelscheibe 7 (s. Abb. 34) extrahierten und im SDS-Gel getrennten Polypeptide. Die verwendeten Standardproteine (—○—) sind β -Galaktosidase (130 000), Phosphorylase a (94 000), Rinderserumalbumin (68 000), Pyruvatkinase (57 000), Fumarase (49 000), Hefe-Aldolase (40 000), Ribonuklease (14 000). Die Banden (P21-P115) aus Gelscheibe 7 sind als horizontale Striche eingezeichnet.

zwischen 21 000 und 115 000 enthält. Das Ergebnis legt nahe, daß in Gelscheibe 7 neben der DNA-Polymerase noch weitere Proteine enthalten sind. Welche der 10 Polypeptidketten Untereinheiten von DNA-Polymerase darstellen, kann daher noch nicht entschieden werden.

3.5. Versuche zur Methodik

3.5.1. DNase I Behandlung des markierten Reaktionsproduktes

Es wurde ein Standardpolymerasetest mit 140 mM K^+ und 5 mM Mg^{++} durchgeführt. Nach dem Lösen des Niederschlags in 0,5 ml 0,5 N Natronlauge wurden zwei Ansätze wie im normalen Polymerasetest erneut mit 3 ml 0,5 N PCA gefällt, vier weitere mit 250 μ l 1 N Salzsäure neutralisiert. Die eine Hälfte davon wurde mit 2 ml Tris-Mg-Puffer ohne DNase I (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Magnesiumacetat) versetzt, die andere mit demselben Puffer, der 100 μ g DNase I/ml enthielt und drei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml 0,5 M PCA zugegeben und 30 min bei 4°C stehengelassen, zentrifugiert bei 3400 Upm, 10 min (IEC Zentrifuge) und der Überstand abgesaugt. Der Niederschlag wurde in 0,5 ml 0,5 N Natronlauge gelöst, erneut mit 3 ml kalter 0,5 M PCA gefällt und 30 min bei 4°C stehengelassen. Alle Ansätze wurden dann durch GF/C-Filter abfiltriert.

Im Blindversuch ging etwa die Hälfte der ursprünglich eingebauten Aktivität verloren. Das Material war nach dreistündigem Einwirken der DNase nicht mehr säurefällbar, was zum völligen Verschwinden der Aktivität führte.

Aus diesem Versuch ist zu schließen, daß das radioaktive Nukleotid tatsächlich in DNA eingebaut wurde.

3.5.2. Zunahme der Aktivität von Homogenat und Homogenat-Überstand bei Lagerung

Es wurde zunächst beobachtet, daß die Aktivitäten von Homogenat und Homogenat-Überstand oft stark schwankten.

Nach einer Reihe von Versuchen bestätigte sich die Vermutung einer Abhängigkeit der Aktivitätshöhe vom Zeitpunkt des Austestens. Nimmt man frisch bereitetes Homogenat bzw. Homogenat-Überstand, dann ergaben sich immer die niedrigsten Werte. Nach drei Tagen konnte eine Verdoppelung der Aktivität in beiden Präparationen gemessen werden. Wie diese Steigerung zustande kommt, ist unklar. Es könnte ein Hemmstoff daran beteiligt sein, der mit zunehmender Dauer der Lagerung immer mehr an Wirksamkeit verliert. Auch die beobachtete Erhöhung der Aktivität nach DEAE-Ionenaustauschchromatografie würde zu dieser Vorstellung passen (s. Abschnitt 3.1.3. DEAE-Sephadex A25 Chromatografie I). Von Murakami-Murofushi, Nagano und Mano wurde 1976 das Vorkommen eines Proteins in *Physarum polycephalum* nachgewiesen, das DNA-Polymerase hemmt (92).

3.5.3. Einfluß verschiedener Reagenzien auf die DNA-Polymeraseaktivität

3.5.3.1. Ammoniumsulfat

Da in der präparativen Aufarbeitung Ammoniumsulfat als Fällungsmittel verwendet wurde, sollte dessen Einfluß auf die Aktivität untersucht werden. Die ausgiebig dialysierte Lösung des Ammoniumsulfat-Niederschlages wurde mit Puffer 1 + 9 verdünnt und bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen getestet. Wie in Abb. 36 dargestellt, wirken Konzentrationen von größer als 5 mM stark hemmend auf die Polymeraseaktivität. Ammoniumsulfat muß also vor dem Polymerasetest gründlich herausdialysiert werden.

3.5.3.2. Harnstoff

Die Formen A_1 und A_2 (8S) von DNA-Polymerase aus Kalbsthymus konnten nach Dissoziation einer Unter-einheit durch die Einwirkung von 2,4 M Harnstoff in die Form C (7,3 S) übergeführt werden (21).

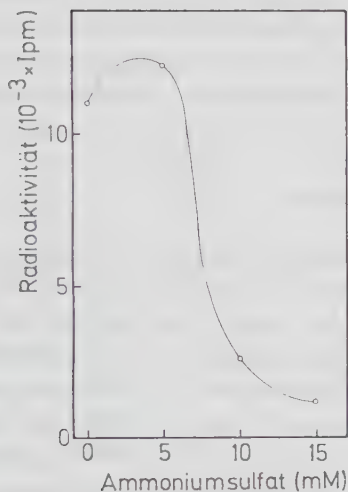


Abb. 36: Wirkung von Ammoniumsulfat auf die DNA-Polymeraseaktivität.

Es sollte deshalb geprüft werden, ob die Zugabe von Harnstoff auch zu einer Vereinheitlichung führt. Zu diesem Zweck mußte zunächst der Einfluß auf die Aktivität untersucht werden. Bis zu 1,6 M Harnstoff im Testansatz konnte keine aktivitätsvermindernde Wirkung festgestellt werden; bei einer Konzentration von 2,4 M sank die Aktivität auf 50% ab. Ließ man 2,5 M Harnstoff 24 Stunden auf eine Enzympräparation aus dem Reinigungsschritt 2 einwirken, so waren noch 20% der Aktivität erhalten geblieben; nach dreitägiger Einwirkung waren es nur noch 6%. Wurde nach 24-stündiger Einwirkung der Harnstoff durch Dialyse wieder entfernt, so kehrte die ursprüngliche Aktivität nicht mehr zurück.

Auf eine Sepharose CL 6B Säule, äquibriert mit 2,5 M Harnstoff in Puffer 2, wurde gelöster Ammoniumsulfat-Niederschlag aufgetragen. Die Aktivitätsverteilung war ebenso heterogen wie ohne Harnstoff. Auch weitere Versuche zeigten, daß Harnstoff keinen Einfluß auf das Molekulargewicht und die Heterogenität der DNA-Polymerase hat.

3.5.3.3. β -Mercaptoäthanol

Der Hintergrund für diesen Versuch lag in der Idee, für die nicht-denaturierende Elektrophorese ein Gel zu verwenden, aus dem durch Auflösen der Gelmatrix das Enzym leicht wiederzugewinnen wäre. Zu diesem Zweck kann man den üblichen Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylat ersetzen durch Cystindiacrylat. Läßt man auf diese Substanz reduzierende Agenzien, z.B. β -Mercaptoäthanol einwirken, so wird die Disulfid-Brücke gespalten und das Gel zerfällt. Es sollte geprüft werden, ob das Enzym in den dafür notwendigen Konzentrationen seine Aktivität einigermaßen behält.

Zu 20 μ l einer Enzympräparation aus der Reinigungsstufe 5 wurden 1, 3, 5 und 10 μ l β -Mercaptoäthanol pipettiert. Nach 5 min bei 0-4°C wurde der Rest des Testgemisches zugegeben und wie im Standardtest weiterbehandelt. Bereits 1 μ l β -Mercaptoäthanol hemmt die Aktivität zu 1/3, 3 μ l zu 2/3, bei 5 μ l ist keine Enzymaktivität mehr feststellbar. Offenbar besitzt das Enzymmolekül Disulfid-Brücken, deren Zerstörung Aktivitätsverlust und Denaturierung zur Folge hat. Die im Test und in den Puffern vorhandene Menge β -Mercaptoäthanol von 3 mM bewirkt jedoch eine leichte Stimulierung gegenüber der Abwesenheit von β -Mercaptoäthanol.

3.5.3.4. Natriumazid

Die Zugabe von 0,02% Natriumazid zu Puffern und Lösungen dient der Verhinderung mikrobiellen Wachstums. Gelfiltrationssäulen und Kationenaustauscher wurden vor längerem Nichtgebrauch mit Natriumazid äquilibriert. Ein Test zeigte, daß 0,02% Natriumazid zu 20% und 0,1% zu 40% hemmt. Vor Gebrauch muß diese Substanz daher durch ausgiebiges Waschen wieder entfernt werden.

3.5.3.5. ATP-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Der Frage, ob in den Reaktionen des DNA-Polymerasetestes ein ATP-abhängiger Schritt enthalten ist, wurde in einem Versuch nachgegangen, in dem 2,5 mM ATP an- bzw. abwesend waren. Da ATP 1 Mol Mg^{++} bindet und so dem Reaktionsgemisch entziehen würde, sind zusätzlich 2,5 mM Mg^{++} zugegeben worden. Die Konzentration an freiem Mg^{++} im Test war 5 mM, an K^+ 140 mM. Der Unterschied der Aktivität bei An- oder Abwesenheit von ATP war jedoch nicht signifikant.

3.5.4. Geschieht die Bindung von DNA-Polymerase an DEAE-Ionenaustauscher über Nukleinsäuren?

Die DNA-Polymeraseaktivität eluierte aus DEAE-Ionenaustauschern bei unterschiedlichen Leitfähigkeiten des Elutionspuffers. Mit dem Vorkommen mehrerer Formen der DNA-Polymerase läßt sich das heterogene Verhalten nicht erklären, denn gereinigtes Enzym (s. Abschnitt 3.1.5. und 3.4.1.5.) eluiert bei nur einer Leitfähigkeit. Es sollte geprüft werden, ob am Enzym anhaftende Nukleinsäuren für die Heterogenität verantwortlich sind.

Um diese Frage zu klären, wurde der eingeeingte Homogenat-Überstand mit DNase I behandelt, anschließend einer Gelfiltration über Sepharose CL 6B unterworfen und auf DEAE-Sephadex aufgetragen.

Zu 1,5 ml eingengtem Überstand wurden 50 µl einer DNase I Lösung (3 mg/ml) und 150 µl einer 0,1 M Magnesiumacetat-Lösung gegeben (Endkonzentration für DNase 100 µg/ml, für Mg^{++} 10 mM). Die DNase konnte einmal 4 und einmal 21 Stunden bei 4°C einwirken, bevor der Ansatz auf die Sepharose CL 6B Säule gegeben wurde, um die DNase I abzutrennen. Das Molekulargewicht der DNase I beträgt 31 000, im Gegensatz zur DNA-Polymerase, die auf dieser Stufe noch ein Molekulargewicht von 900 000 hat. Die aktiven Fraktionen der Sepharose Säule wurden gepoolt und auf DEAE-Sephadex gegeben. Das Enzym verhielt sich nicht anders als ohne DNase-Behandlung. Die DNA-Polymerase haftete also nicht an DNase-sensitiven DNA-Fragmenten, die eine Bindung an DEAE-Sephadex bewirken würde.

Auf der anderen Seite scheint die Bindung an DEAE-Ionenaustauscher eine "Alterserscheinung" zu sein. Gibt man frisch hergestellten Homogenat-Überstand sofort auf eine DEAE-Sephadex oder -Cellulose Säule, so wird nur wenig DNA-Polymerase adsorbiert. Läßt man den Überstand dagegen über Nacht stehen oder gibt ihn wie bei der Anreicherung zuerst auf eine Sepharose Säule, so bindet das Enzym an DEAE-Sephadex.

Ein geänderter Ladungszustand des Moleküls, wie er durch kovalente Modifizierung, z.B. Phosphorylierung, hervorgerufen sein könnte, wäre eine mögliche Ursache dieses Verhaltens.

3.5.5. Verhalten von DNA-Polymerase nach Chromatografie an Phospho-Cellulose

Enzym wurde in der Weise präpariert, daß nach dem Homogenisieren ein Reinigungsschritt über DEAE-Sephadex A25 erfolgte, bevor auf Phospho-Cellulose aufgetragen wurde. Das Ergebnis dieses Säulenlaufs zeigt Abb. 37 A. Da Phospho-Cellulose in der Regel weniger gute Ausbeuten als DNA-Cellulose brachte, sollte versucht werden,

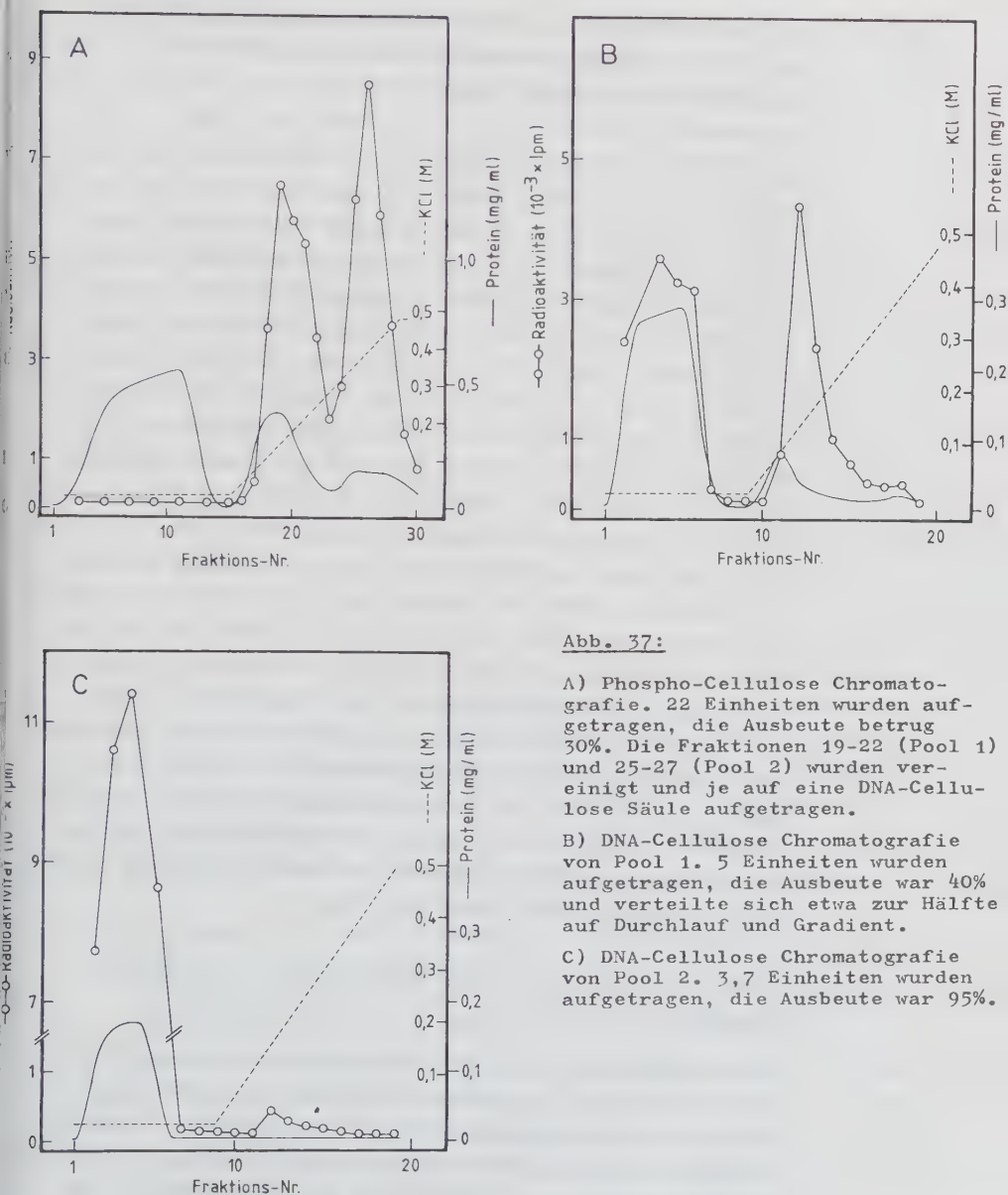


Abb. 37:

A) Phospho-Cellulose Chromatografie. 22 Einheiten wurden aufgetragen, die Ausbeute betrug 30%. Die Fraktionen 19-22 (Pool 1) und 25-27 (Pool 2) wurden vereinigt und je auf eine DNA-Cellulose Säule aufgetragen.

B) DNA-Cellulose Chromatografie von Pool 1. 5 Einheiten wurden aufgetragen, die Ausbeute war 40% und verteilte sich etwa zur Hälfte auf Durchlauf und Gradient.

C) DNA-Cellulose Chromatografie von Pool 2. 3,7 Einheiten wurden aufgetragen, die Ausbeute war 95%.

Phospho-Cellulose in einem frühen Schritt zu verwenden, bei dem noch verhältnismäßig viel Protein in der Präparation vorhanden ist, und erst später die DNA-Cellulose.

Das Elutionsprofil ist ähnlich wie bei der DNA-Cellulose (s. Abb. 6). Der zweite Aktivitätsgipfel bei 28-33 mS/cm ist allerdings nicht immer so deutlich ausgeprägt. Manchmal erscheint er nur als breite Schulter. Wenn man die Proteinkurve betrachtet, ist der Reinigungseffekt ähnlich dem der DNA-Cellulose. Auch der Anreicherungsfaktor ist vergleichbar. Die Fraktionen 19-22 (0,14-0,24 M KCl) und 25-27 (0,35-0,43 M KCl) wurden vereinigt und Pool 1 bzw. Pool 2 genannt. Nach Dialyse wurden sie jeweils auf DNA-Cellulose gegeben. Abb. 37B zeigt das Ergebnis der Elution von Pool 1 aus DNA-Cellulose und Abb. 37C das von Pool 2. Pool 1 erscheint etwa zur Hälfte im Durchlauf und zur Hälfte im Gradienten, Pool 2 dagegen vollständig im Durchlauf. Nach Chromatografie an Phospho-Cellulose kann die DNA-Cellulose nicht mehr zur Reinigung verwendet werden. Ja, es zeigte sich sogar, daß eine Rechromatografie an Phospho-Cellulose nicht mehr sinnvoll ist, denn 90% der aufgetragenen Aktivität erscheint dann im Durchlauf. Die Ursache der verlorengegangenen Affinität zur Phospho-Cellulose ist unklar. Es könnte sein, daß an der Phospho-Cellulose etwas vom Enzym abgetrennt wurde, was für die Bindung verantwortlich ist.

3.5.6. Einfluß der Proteinkonzentration auf den Sedimentationskoeffizienten

Mikroplasmodien wurden im Verhältnis 1 + 4 mit Puffer 1 und einer Spatelspitze PMSF im Potter bei 0°C und 1500 Upm durch achtmaliges Auf- und Abbewegen homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren in einer IEC/B60 Ultrazentrifuge für eine Stunde bei 50 000 Upm wurde der Überstand geteilt und je eine Hälfte gegen 0,4 M Ka-

liumchlorid in Puffer 2 mit 30% PEG bzw. 0,8 M Kaliumchlorid in Puffer 2 mit 30% PEG dialysiert und auf $1/3 - 1/5$ eingeengt. Zu 200 μ l dieser Enzympräparation wurden die Markerenzyme gegeben (s. Abschnitt 4.2.13.), 250 μ l davon auf 5-20% Saccharosegradienten in 0,4 M KCl, 0,1% BSA in Puffer 2 bzw. 0,8 M KCl, 0,1% BSA in Puffer 2 gegeben und in einer IEC/B60 Ultrazentrifuge in einem SW Rotor Nr. 498 16 Stunden bei 58 000 Upm zentrifugiert. Wie Abb. 38 zeigt, ergaben sich Sedimentationskonstanten zwischen 7,5 S und 11 S in 0,4 M KCl und 0,8 M KCl. Trägt man auf die Gradienten jedoch uneingeengte Enzympräparation auf, so erhält man in beiden Kaliumchloridkonzentrationen einen einheitlichen Peak bei 7,0 S. Bei hohen Proteinkonzentrationen (6-10 mg/ml) bildet die DNA-Polymerase auch in 0,8 M KCl nicht-dissoziabile Aggregate. Ein in gleicher Weise aufbereiteter Überstand wurde gegen 0,4 M KCl, 1,6 M Harnstoff in Puffer 2 dialysiert und auf einen Gradienten aufgetragen. In zwei Versuchen, in denen parallel ein Gradient mit 0,4 M KCl in Puffer 2 getestet wurde, ergaben sich im Gradienten mit Harnstoff Sedimentationskonstanten von 7,9 S im Gegensatz zu 7,0 S in den harnstofffreien Gradienten. Die Ursache dieser unerwarteten Erhöhung des S-Wertes ist unklar, weil der Sedimentationskoeffizient eher niedriger, mindestens jedoch gleich bleiben sollte.

3.5.7. Stabilität von DNA-Polymerase-Präparationen

Die Stabilität von DNA-Polymerase auf der letzten Stufe der Anreicherung erwies sich als erstaunlich hoch. So enthielt Schritt-5 Enzym nach 3-wöchiger Aufbewahrung bei 4°C in Puffer 2 noch 60% der ursprünglichen Aktivität. Unter gleichen Bedingungen war die Form D aus der Aufarbeitung mit Ammoniumsulfat nach drei Monaten noch ebenso aktiv wie unmittelbar nach der Präparation.

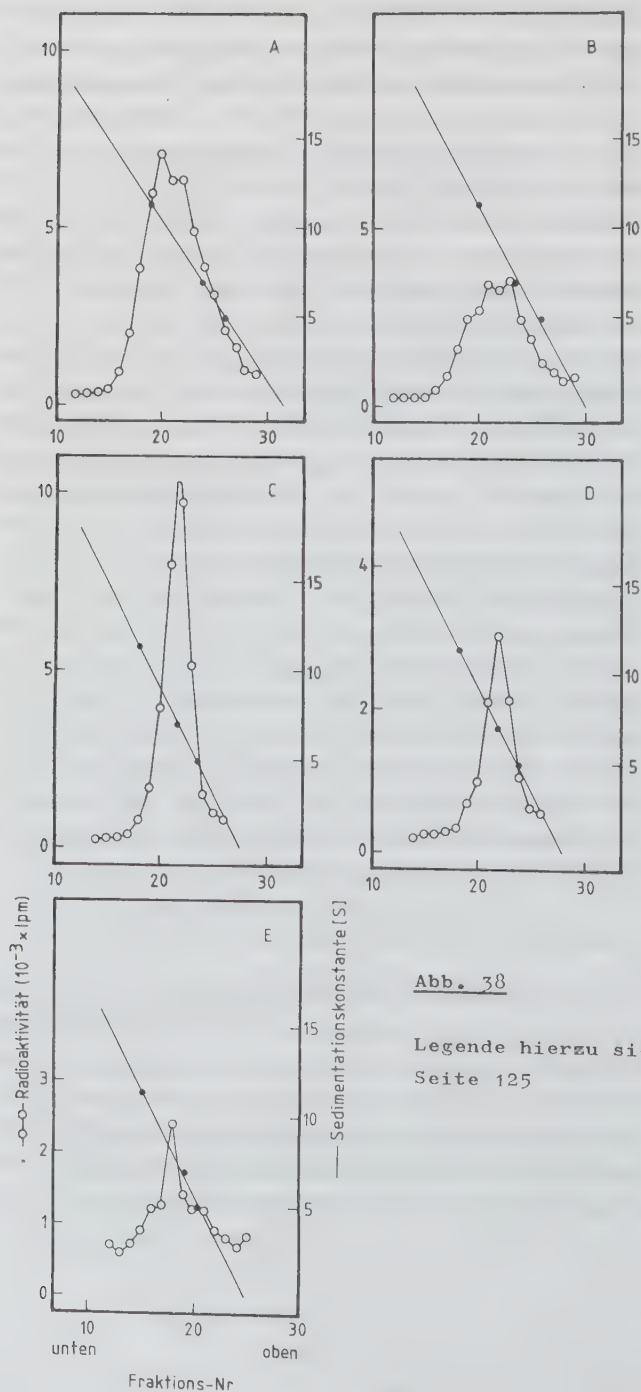


Abb. 38

Legende hierzu siehe
Seite 125

Die gemessenen Aktivitäten nach dem starken Verdünnen einer Enzympräparation erwiesen sich als nicht proportional. Wurde zweimal nacheinander im Verhältnis 1:10 verdünnt, so fanden sich nur noch 5-20% der erwarteten Aktivität wieder.

Auf der anderen Seite wurden in Präparationen mit hohem Proteingehalt (Homogenat, Lösungen von Ammoniumsulfat-Niederschlägen) nach dem Verdünnen auf 1:5 bis 1:10 höhere Aktivitäten gemessen als zuvor. Dies dürfte wohl auf einen Quench-Effekt durch Protein beim Auszählen der Proben im Szintillationszähler beruhen.

Legende zu Abb. 38

Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.

A) 200 μ l Homogenat-Überstand, eingeengt und gegen 0,4 M KCl in Puffer 2 dialysiert wurden aufgetragen (0,45 Einheiten, 2 mg Protein). Die Sedimentationskonstanten liegen bei 10,4 und 8,6 S.

B) 200 μ l Homogenat-Überstand, eingeengt und gegen 0,8 M KCl in Puffer 2 dialysiert wurden aufgetragen (0,45 Einheiten, 2 mg Protein). Von den Fraktionen wurden wegen der hohen Kaliumchloridkonzentration nur 10 μ l zum Polymerasetest verwendet. Die Sedimentationskonstanten liegen bei 10,4 und 7,8 S.

C,D) 200 μ l uneingeengter Homogenat-Überstand gegen 0,4 M KCl (C) und 0,8 M KCl (D) in Puffer 2 dialysiert wurden auf die Gradienten aufgetragen (0,22 Einheiten, 0,4 mg Protein). Vom Gradienten mit 0,8 M KCl wurden nur 10 μ l im Test verwendet. Die Sedimentationskonstante ist 7,0 S.

E) 200 μ l uneingeengter Homogenat-Überstand wurde gegen 0,4 M KCl, 1,6 M Harnstoff in Puffer 2 dialysiert und aufgetragen (0,12 Einheiten, 0,4 mg Protein). Die Sedimentationskonstante liegt bei 7,9 S.

4. Zusammenfassung

DNA-Polymerase aus exponentiell wachsenden Mikroplasmoiden von *Physarum polycephalum* wurde 1400-fach angereichert. In den Präparationen waren verschiedene Formen der DNA-Polymeraseaktivität enthalten, die sich in Gelfiltration und Dichtegradientenzentrifugation ungewöhnlich verhielten.

Die Stokesschen Radien waren 6,5 nm für Form A, 5,5 nm für Form B und 4,7 nm für Form C; die Sedimentationskoeffizienten betrugen 7,6 S (Form A) 5,2 S (Form B) und 3,8 S (Form C). Aus diesen Werten wurden die Molekulargewichte der Formen A, B und C zu 204 000, 116 000 und 73 000 berechnet. Die Reibungsquotienten von 1,69 lassen auf eine stark hydratisierte und/oder eine asymmetrische Struktur der Moleküle schließen.

Da die Form A auch bei 0,8 M Kaliumchlorid im Saccharose-Dichtegradienten gefunden wurde, stellt sie wahrscheinlich kein Aggregationsprodukt dar. Im Schritt-1 Enzym bildete die Form A die Hauptmenge der DNA-Polymeraseaktivität, was vermuten läßt, daß diese Form auch in vivo vorkommt. Die kleineren Formen B und C hingegen könnten Abbauprodukte sein, die im Laufe der Präparation entstanden sind.

Die vom Enzym katalysierte Reaktion war sensitiv gegenüber SH-Gruppen-Blockern wie N-Äthylmaleinimid (60% Hemmung bei 1 mM) und p-Hydroxymercuriphenylsulfonat (95% Hemmung bei 50 μ M). Heparin verursachte in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml eine 50-70%ige Hemmung, die sich durch höhere Dosen nicht mehr verstärkte. Die Hemmbarkeit der DNA-Polymerase ausschließlich durch das Vitamin B6 Derivat Pyridoxal-5'-phosphat, wobei Aldehyd- und Phosphatgruppe essentiell sind, deutet darauf hin, daß ein Arginin- oder Lysinrest im aktiven Zentrum an der Wechselwirkung mit dem Substrat beteiligt ist. Ferner scheint eine ionische Wechselwirkung des Enzyms mit der Phosphatgruppe des Pyridoxalphosphates bzw. den Phosphatgruppen der Desoxynukleotide stattzufinden.

Die Enzymaktivität wurde durch 30 mM Natriumchlorid stimuliert.

Die am meisten bevorzugte Starter-Matrize war aktivierte DNA, schlecht waren denaturierte DNA, $p(dA) \cdot (dT)_{12}$ und $p(dA) \cdot (rU)_{12-18}$; nicht akzeptiert wurden native DNA und $p(A) \cdot (dT)_{12}$.

Die Michaeliskonstante für die Desoxynukleosid-5'-triphosphate war 3 μM , für dTTP bei konstanter 50 μM Konzentration der anderen drei Nukleotide 2 μM , für aktivierte DNA 50 $\mu g/ml$ und für Mg^{++} bei optimaler Menge an K^+ von 150 mM etwa 0,6 mM.

Ein Verfahren zur Zucht von Mikroplasmodien in kg-Mengen wurde entwickelt, um genügend DNA-Polymerase für die Durchführung eines weiteren elektrophoretischen Reinigungsschrittes zu gewinnen. Dabei wurde eine neue Form D gefunden, die einen Stokesschen Radius von 3,70 nm und eine Sedimentationskonstante von 5,0 S hatte. Daraus errechnete sich ein Molekulargewicht von 78 000 und ein Reibungsquotient von 1,31. Diese Form D verhielt sich wie ein globuläres Protein, im Gegensatz zu den Formen A, B und C.

Die nicht-denaturierende Elektrophorese brachte eine insgesamt 14 000-fache Anreicherung von DNA-Polymerase der Form D. Ein definierter isoelektrischer Punkt von 5,4 konnte nur bei der Form D gefunden werden; das Gemisch der anderen bewegte sich im Bereich zwischen 6,5 und 7,5.

Spermidin übte einen stimulierenden Effekt auf Enzym aus, das noch nicht durch eine DEAE-Säule gelaufen ist. Form D war durch Spermidin nicht stimulierbar.

Zur Anreicherung mittels nicht-denaturierender Elektrophorese wurde ein präparatives Verfahren mit einem Flachbettgel verwendet, woraus das Enzym nach dem Homogenisieren des entsprechenden Gelstreifens durch Diffusion wiedergewonnen wurde.

Literaturverzeichnis

1. Alberts, B. und Sternglanz, R. (1977) Nature 269, 655-661
2. McMacken, R., Bouché, J.P., Rowen, S.L., Weiner, J.H., Ueda, K., Thelander, L., McHenry, C. und Kornberg, A. (1977) in "Nucleic Acid - Protein Recognition" (Vogel, H.J., Hrsg.), S. 15-29, Academic Press, New York.
3. Ghosal, D. und Saedler, H. (1978) Nature 275, 611-617
4. Falaschi, A. und Pedrini, A.M. (1977) in "DNA Synthesis" (Molineux, I. und Kohiyama, M. Hrsg.), 895-913, Plenum Press, New York-London.
5. Reichard, P. (1978) Fed. Proc. 37, 9-14
6. Brynolf, K., Eliasson, R. und Reichard, P. (1978) Cell 13, 573-580
7. Holmes, A.M. und Johnston, I.R. (1975) Febs Letters 60, 233-243
8. McHenry, C. und Kornberg, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6478-6484
9. Wickner, S.H. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 1163-1191
10. Kornberg, A. (1974) "DNA Synthesis", S. 193, Freeman, San Francisco
11. Weissbach, A. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 25-47
12. Sheinin, R. und Humbert, J. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 277-316
13. Weissbach, A., Baltimore, D., Bollum, F., Gallo, R. und Korn, D. (1975) Science 190, 401-402
14. Bauer, G. und Hofschneider, P.H. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 3025-3029

15. Momparler, R.L., Rossi, M. und Labitan, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 285-293
16. Foster, D.N. und Gurney, T. (1976) J. Biol. Chem. 251, 7893-7898
17. Herrick, G., Spear, B.B. und Veomett, G. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1136-1139
18. Loeb, L.A., Fansler, B., Williams, R. und Mazia, D. (1969) Exp. Cell. Res. 57, 298-304
19. Wintersberger, E. (1977) TIBS - March 77, 58-61
20. Holmes, A.M., Hesslewood, I.P. und Johnston, I.R. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 487-499
21. Holmes, A.M., Hesslewood, I.P. und Johnston, I.R. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 229-235
22. Fisher, P.A. und Korn, D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6528-6535
23. Bollum, F.J. (1975) Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 15, 109-144
24. Wintersberger, E. (1974) Eur. J. Biochem. 50, 41-47
25. Sedwick, W.D., Wang, T. S-F. und Korn, D. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7045-7056
26. Chang, L.M. S. und Bollum, F.J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3398-3404
27. Sedwick, W.D., Wang, T., S-F. und Korn, D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5026-5033
28. Tsurno, T. und Ukita, T. (1975) J. Biochem. Tokyo 77, 863-866

29. Bertazzoni, U., Stefanini, M., Pedrali Noy, G., Giulotto, E., Nuzzo, F., Falaschi, A. und Spadari, S. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 785-789
30. Bolden, A., Aucker, J. und Weissbach, A. (1975) J. Virol. 16, 1584-1592
31. Chang, L.M.S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3789-3795
32. Matsukage, A., Bohn, E.W. und Wilson, S.H. (1975) Biochemistry 14, 1006-1020
33. Knopf, K.-W., Yamada, M. und Weissbach, A. (1976) Biochemistry 15, 4540-4548
34. Spadari, S. und Weissbach, A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5809-5815
35. Gallagher, R.E., Todaro, G.J., Smith, R.G., Livingston, D.M. und Gallo, R.C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1309-1313
36. Gerard, G.F. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 706-711
37. Yoshida, Y., Ando, T. und Kondo, T. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1193-1201
38. Bolden, A., Pedrali-Noy, G. und Weissbach, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3351-3356
39. Hübscher, U., Kuenzle, C.C. und Spadari, S. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 249-258
40. Bertazzoni, U., Scovassi, A.I. und Brun, G.M. (1977) Eur. J. Biochem. 81, 237-248
41. McLennan, A.G. und Keir, H.M. nicht veröffentlicht
42. Banks, G.R., Holloman, W.K., Kairis, M.V., Ad Spanos und Yarranton, G.T. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 131-142

43. Banks, G.R. und Yarranton, G.T. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 143-150
44. Whittaker, R.H. (1969) Science 163, 150-160
45. Schiebel, W. (1973) Ber. Deutsch. Bot. Ges. 86, 11-38
46. Schiebel, W. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 334
47. Holtz, E. (1977) Diplomarbeit, Tübingen
48. Golombeck, J., Wolf, W. und Wintersberger, E. (1974) Molec. gen. Genet. 132, 137-145
49. Daniel, J.W. und Baldwin, H.H. (1964) Methods Cell Physiol. 1, 9-41
50. Taylor, J.F. (1953) in "The Proteins", (Neurath, H. und Bailey, K., Hrsg.), 1. Auflage, Vol. 1a, S. 54 f., Academic Press, New York
51. Jockusch, B.M. und Walker, I.D. (1974) Eur. J. Biochem. 48, 417-425
52. Zillig, W., Zechel, K. und Halbwachs, H.-J. (1970) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 221-224
53. Weissbach, A., Poonian, M. (1974) Methods Enzymol. 34, 469
54. Ryan, L.D. und Vestling, C.S. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 279-284
55. Cuatrecasas, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059-3065
56. Iverius, P.-H. (1971) Biochem. J. 124, 677-683
57. Siegel, L.M. und Monty, K.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 346-362
58. Andrews, P. (1970) Methods Biochem. Anal. 18, 1-53

59. Gelotte, B.J. (1960) J. Chromatogr. 3, 330-342
60. Porath, J. (1963) Pure Appl. Chem. 6, 233-244
61. Martin, R.G. und Ames, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379
62. Daniel, J.W. und Rusch, H.P. (1961) J. Gen. Microbiol. 25, 47-59
63. Lang, C.A. (1958) Anal. Chem. 30, 1692
64. Jander-Wendt (1954) "Analytische und präparative anorganische Chemie", S. 69
65. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
66. Betriebsanleitung der Fa. Intertechnik zum Multi-8 Computer
67. Jordan-Engeln, G., Reutter, F. (1978) "Numerische Mathematik für Ingenieure", 2. Auflage, S. 173-178
Bibliographisches Institut AG, Mannheim
68. Erna Weber (1964) "Grundriß der Biologischen Statistik", 5. Auflage, S. 263 f, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
69. Layne, E. (1951) Methods Enzymol., 3, 451-454
70. Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315-323
71. Loeb, L.A. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1672-1681
72. Präparationsanleitung der Fa. Collaborative Research, Inc. Waltham, Mass.
73. Holmes, A.M., Hesslewood, I.P. und Johnston, I.R. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 229-235

74. Weber, K., Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
75. O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007-4021
76. Vesterberg, O., (1971) Biochem. Biophys. Acta 243, 345-348
77. Le Stourgeon, W.M., Wray, W. (1974) in "Acidic Proteins of the Nucleus", (Cameron, I.L. und Jeter, J.R. jr., Hrsg.), S. 98f, Academic Press, New York
78. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
79. Mirault, M.E. und Scherrer, K. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 372-386
80. Brakel, C.L. und Blumenthal, A.B. (1977) Biochemistry 16, 3107-3143
81. McHenry, C. und Kornberg, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6478-6484
82. Holmes, A.M. und Johnston, I.R. (1973) FEBS Lett. 29, 1-6
83. King, A.M.Q. und Nicholson, B.H. (1971) J. Mol. Biol. 62, 303-319
84. Chin, J.F. und Sung, S.C. (1972) Biochim. Biophys. Acta 281, 535-542
85. Morrison, J.M. (1976) Biochem. Soc. Transaction 4, 810-811
86. Loeb, L.A., Agarwal, S.S., Dube, D.K., Gopinathan, K.P., Travaglini, E.C., Seal, G. und Sirover, M.A. (1977) Pharmac. Ther. A 2, 171-193
87. Cozzarelli, N.R. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 641-668

88. Lazarus, L.H. und Kitron, N (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 414-419
89. Shimada, T., Yamada, M., Miwa, M., Nagano, H. und Mano, Y. (1978) Nucl. Acids. Res. 5, 3427-3438
90. Modak, M.J. (1976) Biochemistry 15, 3620-3626
91. Chin, J.F. und Sung, S.C. (1973) Biochim. Biophys. Acta 331, 54-60
92. Murakami-Murofushi, K., Nagano, H. und Mano, Y. (1976) J. Biochem. (Tokyo) 80, 735-741
93. Zänker, K.S. und Schiebel, W. (1978) Biochem. J. 171, 445-451
94. Chang, L.M.C. (1976) Science 191, 1183-1185

Lebenslauf

- 11.8.1951 geboren in Burgberg, Kreis Oberallgäu, als
erstes von drei Kindern der Eheleute Anton
Bär und Edeltraud, geb. Herzig.
- 1957-1963 Volksschule Burgberg
- 1963-1967 Realschule Sonthofen
- 1967 Mittlere Reifeprüfung
- 1967-1970 Allgäu-Gymnasium, Kempten
- 1970 Reifeprüfung
- 1970-1972 Pharmazeutisches Praktikum in der Apotheke
zum Falkenstein in Pfronten
- 1972 Pharmazeutische Vorprüfung
- 1972 Beginn des Studiums der Pharmazie an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1974 Erster Teil des pharmazeutischen Staats-
examens
- 1975 Abschluß des Studiums mit dem zweiten Teil
des pharmazeutischen Staatsexamens
- 1975 Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung
Experimentelle Medizin am Max-Planck-
Institut für Biochemie in Martinsried bei
München

